

**ANREICHERUNG UND REAKTIONSVERHALTEN
VON SCHWEINE-ERYTHROZYTEN- UND
NIERENRINDEN-ANGIOTENSINASEN**

Karl Petschauer

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstände: Prof.Dr.med. K. Kramer
Prof.Dr.med. K. Thureau

ANREICHERUNG UND REAKTIONSVERHALTEN VON
SCHWEINE-ERYTHROZYTEN- UND NIERENRINDEN-ANGIOTENSINASEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Karl Petschauer

aus

Janessen



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. H. Dahlheim

Mitberichterstatter: Professor Dr. K. Thureau

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I) <u>Einleitung</u>	1
A) Klinische Aspekte der Angiotensinase	3
B) Klassifizierung der verschiedenen Angiotensinasen	8
II) <u>Methodik</u>	13
A) Anreicherungsverfahren	13
B) Chemische Charakterisierung der Angiotensinasen	15
C) Nachweis der Angiotensinaseaktivität mit dem Angiotensin-Rattentest	15
III) <u>Ergebnisse</u>	20
Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen des enzymatischen Hypertensin-Abbaues durch verschiedene Angiotensinasen	21
Erythrozytenangiotensinasen	24
1. Blockierung	24
2. Anreicherung	26
3. Angiotensinasewirkung gewaschener Erythrozyten	32
Nierenrindenangiotensinasen	32
1. Differentialzentrifugation	32
2. Blockierungsversuche der durch Ultrazentrifugation aufgetrennten Angiotensinasen	35
3. pH-Abhängigkeit des Hypertensin-Abbaues nach Blockierung mit EDTA bzw. Trasylol	37
4. Auftrennung und Bestimmung des isoelektrischen Punktes mit Hilfe der Methode der isoelektrischen Fokussierung	42
IV) <u>Diskussion</u>	48
V) <u>Zusammenfassung</u>	57
VI) <u>Literatur</u>	59

I) EINLEITUNG

Angiotensin II ist, soweit derzeit bekannt, die stärkste vaso-konstriktorisch wirksame Substanz. Während die physiologische Bedeutung dieses Oktapeptids noch nicht vollständig aufgeklärt ist, kann eine pathogen verminderte Angiotensinaseaktivität möglicherweise eine Ursache bei der Entstehung des renalen Hochdruckes sein.

Das Fließgleichgewicht des Angiotensin II ist von den Aktivitäten des Renins, des Converting Enzyms und der Angiotensinasen abhängig. Während die beiden zuerst genannten Enzyme die Angiotensinbildung katalysieren, dienen die Angiotensinasen der Inaktivierung des Angiotensins.

Das Renin ist in den juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriolen der Niere lokalisiert. Dieses Enzym setzt aus Angiotensinogen, einem im Plasma vorhandenen α_2 -Globulin mit dem Molekulargewicht 57.000, das Dekapeptid Angiotensin I frei (46). Die weitere Umsetzung von Angiotensin I in das vasokonstriktorisch wirksame Oktapeptid Angiotensin II wird - wie allgemein angenommen - durch das sogenannte "Converting Enzyme" in Gegenwart von Cl^- oder NO_3^- katalysiert.

Peptidasen, die das Angiotensin II abzubauen vermögen, werden Angiotensinasen genannt. Aufgrund ihrer chemischen Wirksamkeit faßt man drei Gruppen von Angiotensinasen zusammen:

1. Aminopeptidasen: Diese spalten vom N-terminalen Ende des Angiotensins Aminosäuren ab;
2. Endopeptidasen: Diese spalten das Oktapeptid im Inneren des Moleküls;
3. Carboxypeptidasen: Diese setzen Aminosäuren vom C-terminalen Ende des Oktapeptids frei.

Tabelle I: Freisetzung und enzymatischer Abbau der Angiotensine I und II

ANGIOTENSINOGEN (α_2 -Globulin)

Asp	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Phe	His	Leu	Leu	Val	Tyr	Ser	-Protein
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	

↓
RENIN

ANGIOTENSIN I

Asp	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Phe	His	Leu	
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--

↓
CONVERTING ENZYME + Cl^-

ANGIOTENSIN II

Asp	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Phe
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

↓
 α -AMINOPEPTIDASEN
ENDOPEPTIDASEN
CARBOXYPEPTIDASEN

Inaktive Polypeptide, Aminosäuren

In der Niere sind drei Einflüsse des Angiotensin II von besonderer physiologischer Bedeutung:

1. Die Verminderung der renalen Durchblutung durch Widerstandserhöhungen vornehmlich in den afferenten und vielleicht auch den efferenten Arteriolen;
2. Angiotensin hemmt, wenn es von der perikapillären Seite her appliziert wird, die Natriumrückresorption im distalen Tubulus, wie besonders Ochswadt und Mitarbeiter mit Hilfe von Mikropunktionsuntersuchungen ermittelten (37);
3. 1960 wurde gleichzeitig von den Arbeitsgruppen um Genest und Larah erkannt, daß Angiotensin II über eine Steigerung der Aldosteronsekretion indirekt die Natriumrückresorption

in der Niere beeinflußt (17, 33). Diese indirekte Wirkung des Angiotensins steht im Gegensatz zu seiner direkten auf den distalen Tubulus (37).

Auch auf die Katecholaminfreisetzung hat Angiotensin eine stimulierende Wirkung (16a, 16b, 41, 49). Trotz Aufklärung dieser mannigfaltigen biologischen Wirkungen des Angiotensins wurde den Angiotensinasen im Vergleich zu den anderen Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems weniger Bedeutung beigemessen. Häufig wurden die Angiotensinasen lediglich als Störfaktoren bei der enzymatischen Reninbestimmung erwähnt. Bisher glaubte man, daß es sich bei diesen Enzymen um unspezifisch wirksame Peptidasen handele. Eine mögliche Beeinflussung des Angiotensin-Fließgleichgewichts durch diese Stoffe wurde bislang nur von wenigen Autoren angenommen (6).

A) Klinische Aspekte der Angiotensinase (Tabelle II)

In der Literatur existieren verschiedene Angaben über die Beziehung zwischen dem renalen oder primären Hochdruck und der Angiotensinaseaktivität des Plasmas. Wood berichtete, daß Blut von Patienten mit primärem Hochdruck und ihren Angehörigen eine niedrigere Angiotensinasekonzentration enthält als Blut von Gesunden (54). R.L. Wolf und Mitarbeiter fanden im Gegensatz dazu, daß Serum von Hypertonikern Angiotensin schneller abbaut als Serum von Normotonikern (53). Auch P. Biron und Mitarbeiter sowie Hickler und Mitarbeiter ermittelten bei verschiedenen Hochdruckformen (essentieller Hochdruck, Nierenarterienstenose, maligner Hochdruck) erhöhte Serumangiotensinasespiegel (2, 21). Wolf, Biron und Hickler bestimmten nur die Serum- und nicht die Erythrozytenangiotensinasen, die Wood in seinen Versuchen miterfaßte. Tatsächlich fanden M. Berger und J. Langhans bei Hypertonikern im Plasma erhöhte und in den Erythrozyten erniedrigte Angiotensinaseaktivitäten (1). Die gleiche Veränderung stellten diese Autoren bei Versuchspersonen wäh-

Tabelle II: Angiotensinaseaktivität (Ase) in Blut und Urin bei verschiedenen Krankheitsbildern

Arbeitsgruppen	primärer Hochdruck	Nierenarterien- stenose	tubuläre Nieren- schädigung	Leberkrank- heiten	Schwangerschaft
Wood, J.E. (54)	(Ase) im Blut ↓				
Wolf, R.L., et al. (53)	(Serum-Ase) ↑				
Biron, P., et al. (2)	(Serum-Ase)	(Serum-Ase) ↑			
Berger, M., et al. (1)	(Plasma-Ase) ↑ (Erythrozyten-Ase) ↓				(Plasma-Ase) ↑
Hickler, R.B., et al. (21)	(Plasma-Ase) ↑	(Plasma-Ase) ↑			(Plasma-Ase) ↑
Klaus, D., et al. (30)	(Serum-Ase) -			(Serum-Ase) ↑	(Serum-Ase) -
Hirasawa, K. (22)				(Serum-Ase) ↑	
Brunner, G., et al. (7)				(Serum-Ase) ↑	
Nagatsu, I., et al. (36)	(Serum-Ase) -				(Serum-Ase) ↑
Ripa, R., et al. (43, 44)				(Plasma-Ase) ↑ (Erythrozyten- Ase) ↓	(Plasma-Ase) ↑ (Erythrozyten- Ase) ↓
Ono, T., et al. (39)			(Urin-Ase) ↑		

Abkürzungserklärung: Ase = Angiotensinase ↑ erhöht ↓ erniedrigt - normal

rend der Verrichtung einer körperlichen Arbeit fest. Sie vermuteten, daß die Erythrozyten einen Angiotensinasevorrat enthalten, der bei Bedarf an das Plasma abgegeben werden kann. Dafür spricht ihrer Ansicht nach auch, daß im Hämolysat etwa 140-mal höhere Angiotensinasekonzentrationen vorkommen als im Serum. D. Klaus fand keinen Unterschied in der Serumangiotensinaseaktivität bei Ortho- und Hypertonikern (30). Die von ihm verwendete Methode (Papierchromatographie) bestimmte jedoch nur die am Aminoende angreifenden Angiotensinasen, während die anderen Autoren (1, 2, 21, 53, 54) mit Hilfe des biologischen Testes die Summe aller Angiotensinasen (Endo-, Amino- und Carboxypeptidasen) erfaßten. Auch Nagutsu und Mitarbeiter konnten keine Veränderung der Angiotensinaseaktivität im Serum von Hypertonikern feststellen (36). Allerdings ist auch diese Methode (optischer Test mit synthetischen Substraten) nur für die N-terminal angreifenden Angiotensinasen spezifisch.

Erhöhte Angiotensinasewerte fand Klaus bei Lebererkrankungen, die mit einer massiven Zerstörung von Leberparenchym einhergehen, so bei akuter Hepatitis, hochgradigem Verschlußikterus und Lebermetastasen. Auch Hirasawa bestimmte bei Leberkrankheiten eine Erhöhung der Serumangiotensinase (22). Desgleichen konnten Brunner und Mitarbeiter bei Verwendung verschiedener synthetischer Angiotensinasesubstrate eine erhöhte Serumaktivität an Aminopeptidasen bei Leberparenchymerkrankungen und Verschlußikterus feststellen (7).

Nagutsu wies bei Patienten mit sekundärem Hyperaldosteronismus eine Verminderung des Angiotensinasegehaltes nach (36). Bei Frauen im letzten Schwangerschaftsdrittel fand er eine Erhöhung der Angiotensinaseaktivität. Auch M. Berger und J. Langhans konnten bei Schwangeren und besonders ausgeprägt bei eklampthischen Patientinnen eine Erhöhung der Angiotensinasekonzentration im Serum finden (1). Sie vermuteten den Bildungsort dieser vermehrt vorkommenden Angiotensinasen in der Placenta. R. Ripa und Mitarbeiter fanden da-

rüberhinaus während der normalen Schwangerschaft erhöhte Erythrozytenangiotensinasewerte (43).

Wegen des experimentellen Aufwands des Angiotensinasetests und der bislang verhältnismäßig geringen Aussagekraft hat sich die Bestimmung der Serum- und Erythrozytenangiotensinase bisher nicht in der Klinik durchgesetzt. Jedoch könnte künftig zur Beurteilung von tubulären Nierenschädigungen die Angiotensinaseausscheidung im Urin bedeutsam werden. T. Ono und Mitarbeiter haben die Veränderung der Angiotensinaseaktivität des Urins bei Menschen mit verschiedenartigen Nierenschädigungen und bei Ratten mit experimentell erzeugten Tubulusläsionen (z.B. mit HgCl_2) gemessen (39). Sie bedienten sich dabei synthetischer Angiotensinasesubstrate, L-Leucin- β -Naphthylamid (LNA), L-Glutamyl- β -Naphthylamid (GNA), deren Umsatz spektralphotometrisch verfolgt werden konnte, und verwendeten auch $^5\text{Isoleucin-Angiotensin II}$ im biologischen Test. Dabei fanden sie im Urinsediment von Patienten mit Tubulusschädigungen erhöhte LNA-aseaktivität, während der Serumspiegel dieses Enzyms nicht charakteristisch verändert war. Ratten mit experimentellen Tubulusläsionen hatten auch eine erhöhte LNA-ase- und GNA-aseausscheidung. Darüberhinaus zeigte sich bei Trennung der Urinenzyme mittels einer horizontalen Stärkegel-Elektrophorese bei biologischer Testung eine weitere Angiotensinaseaktivität, die GNA und LNA nicht spaltete (Endo- oder Carboxypeptidase). Elektrophoretisch wurde die Identität der im Urin gefundenen GNA- und LNA-spaltenden Enzyme mit den in der Niere vorkommenden (gleiche Wanderungsgeschwindigkeit) festgestellt. Die im Serum vorkommenden waren davon verschieden. Histochemische Analysen von Nierenschnitten zeigten als den hauptsächlichen Sitz der LNA-ase das Epithel der proximalen Tubuli. Auch H.D. Itskovitz und L. Miller fanden in der Nierenrinde etwa viermal soviel Angiotensinase

wie in der Papille oder in der Medulla (25). Dagegen findet sich in den corticalen Glomerula ein geringerer Angiotensinasegehalt als in den juxtamedullären, wie Mikrodissektionsuntersuchungen von Dahlheim und Mitarbeitern zeigten (9).

Pathophysiologisch interessant sind die Änderungen des Angiotensinasegehaltes der Niere bei verschiedenen experimentell erzeugten Nephropathien. J. Jelinek und H. Mannel fanden bei einseitiger Nierenarterienabklemmung in der ischämischen Niere eine starke Erniedrigung des Angiotensinasegehaltes, die mit der Erhöhung des Reningehaltes im selben Organ einhergeht (27). Dieses scheinbar gegensätzliche Verhalten von Angiotensinase und Renin würde in doppelter Hinsicht zu einer Erhöhung des Angiotensinspiegels führen und könnte daher Ursache für die Widerstandserhöhung in der ischämischen Niere sein. Die von Jelinek und Mannel nachgewiesene verringerte Angiotensinaseaktivität verstärkt die gleichzeitig durch die vermehrte Reninsekretion verursachte erhöhte Angiotensinbildung.

H.D. Itskovitz und L. Miller untersuchten die Veränderung des renalen Angiotensinasegehaltes nach Gabe von Nephrotoxinen (Quecksilberchlorid, Kalium-Natriumtartrat) (25). Aus den gleichzeitig mit der Erhöhung der Angiotensinaseaktivität auftretenden histologischen Veränderungen schlossen die genannten Autoren auf die Lokalisation der Angiotensinase. Quecksilber-II-chlorid verursachte eine Schädigung der proximalen Tubuli und eine gleichzeitige Angiotensinaseverminderung um 40% (gemessen in der Rattenniere). Kalium-Natriumtartrat bewirkte eine Schädigung von proximalen und distalen Tubuli und verminderte den Angiotensinasegehalt um 90%. Eine Abnahme der renalen Angiotensinaseaktivität ohne histologisch nachweisbare Veränderungen verursachte das Quecksilberdiuretikum Meralluride (Mercurhydrin der Fa. Lakeside Labs., USA).

h) Klassifizierung der verschiedenen Angiotensinasen

P.A. Khairallah und Mitarbeiter fanden bei in vitro-Ver-suchen, daß Angiotensin und Angiotensinanaloga sehr schnell durch Blut abgebaut wurden (29, siehe Tabelle III). Sie führten diesen Effekt vor allem auf eine von ihnen sowohl in Erythrozyten als auch im Plasma gefundene Angiotensi-nase zurück, der sie den Namen Angiotensinase A gaben. Dieses Enzym ließ sich durch EDTA vollständig inaktivie-ren. Durch Zugabe von Calcium-Ionen wurde dieser Effekt rückgängig gemacht. Auch Magnesium- und Cobalt-Ionen stell-ten die ursprüngliche Angiotensinaseaktivität teilweise wieder her. Das pH-Optimum dieses Enzyms wurde zwischen 7,5 und 8,0 gefunden. Angiotensinase A unterschied sich von der renal vorkommenden Leucinaminopeptidase durch eine besondere Spezifität für α -L-Asp¹-Angiotensin II (= nat. Angiotensin II vom Schwein). β -Aspartyl-Angiotensin II und Desamino-Angiotensin II (In Desamino-A II ist die N-terminale Aminosäure Asparagin durch Succinat ersetzt) wurden durch die Angiotensinase A sehr viel langsamer ab-gebaut, woraus die Autoren darauf schlossen, daß die An-giotensinase A Angiotensin vom Aminoende aus abbaut.

Untersuchungen von Regoli und Mitarbeitern zeigten, daß die im Serum enthaltenen Angiotensinasen Angiotensin II-Amid (Hypertensin-Ciba) wesentlich schneller abbauen als natürliches Angiotensin II. Am Aminoende veränderte Okta-peptide (z.B. α -D-Asp-A II; β -L-Asp-A II) wurden von Serum langsamer inaktiviert als Angiotensin II. Die im Plasma enthaltenen Angiotensinasen zeigten ähnliche Eigenschaf-ten (42).

Bei Inkubation von Rattennierenhomogenat als Angiotensinase-Präparation wurden dagegen auch die am Aminoende veränder-ten Oktapeptide in stärkerem Maße abgebaut. Für diesen Effekt könnte die Wirkung der von H.Y.T. Yang und Mitar-beitern in Schweinenierenhomogenaten und im menschlichen

Tabelle III: Klassifizierung und Eigenschaften verschiedener Angiotensinasen

Angiotensinasen	Vorkommen	Nachweismethode	Substrat	7,5 - 8,0	mit EDTA, aufheb- bar durch Ca ⁺⁺ , Mn ⁺⁺ , Co ⁺⁺	N-terminal wirk- sam	Khairallah, P.A., et al. (29)
Angiotensinase A (Aminopeptidase)	menschl. Plasma und Erythrozyten	biol. Test (Ratte)	A, β -L-A, Des-A, Arg-A	7,5 - 8,0			
Endopeptidase	Rattenniere, menschl. Plasma	biol. Test (Ratte) Papierchroma- tographie	A, H, β -L-A, β -D-A, Des-A	7,4		spaltet zwischen Tyr4 und Val5	Regoli, D., et al. (42)
Angiotensinase C (Carboxypeptidase)	Lysozymenfraktion der Schweineniere, menschl. Leukozyten, Blutplättchen und Urin	Papierchroma- tographie	H, am Carboxyende veränderte Sub- stratanaloga	5,7	mit DFP (1 mM)	strukturgebunden; Spezifität für Pro	Yang, H.Y.T., et al. (56, 57, 58)
Amino-peptidase	Mikrosomenfraktion (Schweineniere), Schweineplasma und Serum	opt. Test	L- β -Naph.	7,0 - 7,3	mit EDTA, aufheb- bar durch CaCl ₂	strukturgebunden bis 65° C hitze- stabil Mol.-Gew.: 280.000	Wachsmuth, E.D., et al. (52) Kurtz, A.B. (31)
	Rattenplasma	biol. Test (Ratte)	H	7,2 4,0	mit EDTA nicht blockierbar mit EDTA blockier- bar		Dauda, G. (15)
2 Plasma-Asen 3 Erythrozyten- Asen (X, Y)	menschl. Plasma und Hämolyat	biol. Test (Kaninchen) opt. Test	H L- β -Naph.			größter Teil der Ase erscheint mit Albumin (Stärkegel- elektrophorese)	Yamamura, Y., et al. (55)
3 Plasma-Asen (2. Ase=LAP-ase)	menschl. Plasma	biol. Test (Kaninchen) opt. Test	H L- β -Naph.	7,4 - 8,0 (2. Ase)	mit EDTA	Sephadex A 50- Chromatographie 3 Ase-Maxima	Hiwada, K., et al. (23)
	menschl. Plasma	biol. Test (Ratte) opt. Test	H, A	5,6 7,2 (6,8) 8,5 (7,8)	1 mM EDTA aufhebbar mit 2 mM Zn 10 mM EDTA 10 mM EDTA Ca ⁺⁺ (2mM)		Zwanzig, M., Oelkers, W. (59)

Abkürzungserklärung:

- A = α -L-Aspartyl Angiotensin II
 H = α -L-Aspartyl Angiotensin II-Amid (Hypertensin R)
 β -L-A = β -L (D) Aspartyl Angiotensin II
 (D-D-A)
 Des-A = Desamino-Angiotensin II
 Arg-A = Arginyl-Angiotensin II
 L- β -Naph. = L-Leucyl- β -Naphthylamid

Urin gefundene Angiotensinase C verantwortlich sein (56, 57, 58). Dieses Enzym spaltet Angiotensin und Analoga vom Carboxylende aus, wobei die Aminosäure Prolin an 7. Stelle stehen muß. Angiotensin-Analoga, die statt Prolin eine andere Aminosäure aufweisen, wurden nicht von diesem Enzym abgebaut, dessen pH-Optimum bei 5,7 liegt. DFP hemmte die Wirkung dieser Angiotensinase C vollständig. EDTA und andere Chelatbildner waren als Blockierungsmittel unwirksam. Durch einen fluorimetrischen Test (der auf der Freisetzung von 1-Dimethylamino-naphtalen-5-sulfonyl (Dansyl-) prolin aus Dansyl-prolyl-phenylalanin beruht) konnten die Autoren das Enzym schon in sehr geringen Konzentrationen nachweisen. Dazu genügten Substratumsätze von weniger als 1 ng. Mit Hilfe dieser Methode wurde die Angiotensinase C in der Lysosomenfraktion (8.500 g) von Nierenhomogenat gefunden. Yang und Mitarbeiter nahmen an, daß dieses Enzym strukturgebunden ist. Auch Leukozyten und Blutplättchen enthielten diese Angiotensinase, während sie weder im Plasma noch in Erythrozyten gefunden wurde.

Ein anderes in der Niere vorkommendes Enzym spaltet Angiotensin zwischen der 4. und 5. Aminosäure (Tyrosin-Valin). Es wurde von Regoli und Mitarbeitern mit einem pH-Optimum von 7,4 angegeben (38). Die im juxtaglomerulären Apparat der Rattenniere enthaltene Angiotensinase hat ein pH-Optimum im gleichen Bereich - ein Hinweis auf die Identität beider Enzyme (14). Neben diesen Angiotensinasen wurden von anderen Autoren mit Hilfe verschiedener Trennmethoden, Blockierungsversuchen, Bestimmungen der pH-Optima, eine Vielzahl von weiteren Angiotensinasen gefunden, deren Angriffspunkt am Angiotensinmolekül nicht angegeben wurde.

Yamamura und Mitarbeiter untersuchten mit Hilfe einer horizontalen Stärkegel-Elektrophorese die Angiotensinasen des menschlichen Plasmas und des Hämolysats (55). Dabei

fanden sie im Plasma zwei Angiotensinasen, von denen eine mit der Leucinaminopeptidase identisch sein soll (Bestimmung mit synthetischem β -Naphthylamid). Diese verhielt sich bei der Elektrophorese wie das Albumin. Bei Verwendung von Hämolyolat begleitete eine wesentlich größere Leucinaminopeptidaseaktivität das Albumin, die wiederum Angiotensinaseaktivität zeigte. Darüberhinaus konnte Yamamura im Hämolyolat zwei Angiotensinasen nachweisen, die keinerlei Leucinaminopeptidaseaktivität zeigten. Er benannte diese X- und Y-Angiotensinasen.

Hiwada und Mitarbeiter untersuchten mit Hilfe einer Säulenchromatographie am Sephadex Gel DEAE A-50 die Angiotensinaseverteilung des menschlichen Plasmas (23). Dabei konnten im wesentlichen drei verschiedene Angiotensinaseaktivitäten gefunden werden, von denen eine mit der Leucinaminopeptidaseaktivität zusammenfiel. Diese Angiotensinase wies ein pH-Optimum zwischen 7,4 und 8,0 auf und könnte deshalb mit der von Khairallah gefundenen Angiotensinase A identisch sein. Dafür spricht die Hemmung dieses Enzyms mit EDTA, welche auch bei den beiden anderen Angiotensinasen gefunden wurde. Keine der drei Angiotensinasen baute β -Aspartyl-Angiotensin II ab, was ein Hinweis dafür ist, daß sie Angiotensin nur vom Aminoende aus abbauen.

Lauda untersuchte den Abbau von Angiotensin durch Rattenplasma bei verschiedenen pH-Werten (15). Dabei fand er ein pH-Optimum bei pH 7,2 und ein anderes bei 4,0. Letzteres wurde nach Zugabe von EDTA nicht mehr beobachtet.

Auch Zwanzig und Oelkers charakterisierten mit Hilfe einer pH-Abhängigkeit die menschlichen Serum-Angiotensinasen. Sie ermittelten insgesamt drei pH-Optima, die sich jedoch bei Verwendung verschiedener Angiotensinasesubstrate (Angiotensin II-Amid, Angiotensin II) veränderten (59). Dieser Befund führte die Autoren zur Annahme, daß verschiedene Enzyme

Angiotensin und Hypertensin inaktivieren. Es ist jedoch durchaus möglich, daß sich das pH-Optimum bei Verwendung verschiedener Substrate beim gleichen Enzym verändert (11, 13).

Nierenangiotensinasen:

Während sich die meisten klinischen Arbeiten mit den Plasma-Angiotensinasen (30, 36, 38, 53, 59) befassen, wurden in der letzten Zeit wesentliche Befunde für die Bedeutung der organgebundenen Angiotensinasen erhoben (3, 19, 24, 34). Dengler und Mitarbeiter stellten bereits 1960 fest, daß die wesentlichen Angiotensinaseaktivitäten der Niere in den Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen lokalisiert sind (Sedimentation bei 8.500 g bzw. 100.000 g), während der partikelfreie Überstand bei der Ultrazentrifugation von Nierenhomogenat ca. 50 - 80-mal weniger Angiotensinaseaktivität enthält (16).

Wachsmuth und Mitarbeiter fanden in der Mikrosomenfraktion (80 000 g - 90 Minuten) von Schweinenierenhomogenat eine strukturgebundene Aminopeptidase, die mit Hilfe von Toluol und Trypsin in Lösung gebracht werden konnte (52). Für dieses Enzym wurde bei niedrigen Substratkonzentrationen (Leucin- β -Naphthylamid) ein pH-Optimum von 7,2 ermittelt. Bei Verwendung von hohen Substratkonzentrationen verschob sich das pH-Optimum zum pH 9,0. Bei diesem pH war jedoch die Affinität des Substrats zum Enzym wesentlich geringer als beim pH 7,2.

Biron und Mitarbeiter fanden bei einer einzigen Passage des Angiotensins im Leber-, Nieren- oder Beinkreislauf eine Inaktivierung von 60 bis 70% (3). Dabei konnte nur ein geringer Unterschied festgestellt werden, wenn statt α -Asp-Angiotensin II β -Asp-Angiotensin II als Enzymsubstrat verwendet wurde. Das deutet auf die Einwirkung von Carboxy- bzw. Endopeptidasen in den verschiedenen Organkreisläufen hin. Hodge und Mitarbeiter kamen zu ähnlichen Ergebnissen

(24). Sie bestimmten auch die biologische Halbwertszeit von Angiotensin im Kreislauf des Hundes. Sie betrug etwa 3 - 5 Minuten. Im Lungenkreislauf war kein Abbau von Angiotensin nachweisbar. Auch Leary und Ledingham stellten die Bedeutung von organgebundenen Angiotensinasen im Vergleich zu den Plasma-Angiotensinasen heraus (34).

Haas und Mitarbeiter bestätigten die von obigen Autoren gefundenen Ergebnisse (19). Sie fanden jedoch darüberhinaus, daß der Verlust pressorischer Aktivität von Angiotensin im Beinkreislauf nicht auf die Wirkung von Angiotensinasen, sondern auf einen von ihnen angereicherten Cofaktor zurückzuführen sei. Dieser Cofaktor soll kompetitiv die Bindung von Angiotensin II an seine Rezeptoren hemmen. Injektion von Cofaktor allein hatte keine Veränderung des Beinkreislaufes zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Angiotensinasen der Erythrozyten und der Nierenrinde untersucht. Die Abhängigkeit der Angiotensinaseaktivität von der Zusammensetzung des Inkubationsgemisches und das Trennverhalten bei Anwendung verschiedener Trennmethoden wurde zur Charakterisierung dieser Enzyme herangezogen.

II) METHODIK

Zur Gewinnung eines Erythrozytenangiotensinase-Präparates wurde frisches heparinisiertes (10 000 iE/l) Schweineblut mit 900 g 20 Minuten zentrifugiert und das erythrozytenhaltige Sediment mehrmals mit kalter 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Die Erythrozyten wurden mit destilliertem Wasser hämolysiert und die Membranfragmente bei 10 000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert, gefriergetrocknet und für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen verwendet.

Zur Gewinnung von angereicherten Nierenangiotensinasen wurden frische Nieren, die etwa 15 Minuten nach dem Tod der Schweine entnommen waren, verwendet. Die mit einem Skalpell vom Mark abgetrennte Nierenrinde wurde mechanisch zerkleinert und nach Zugabe von 0,9%iger Kochsalzlösung (400 ml zu je 100 g feuchtem Nierengewebe) in eingeschliffenen Glaskolben nach Potter 3 Minuten lang homogenisiert. Die Temperatur des Homogenats lag fortwährend unterhalb 4° C.

A) Anreicherung der Erythrozyten- und Nierenangiotensinasen

Die Erythrozytenangiotensinasen wurden mit Hilfe einer Säulengelchromatographie am Sephadex Gel G 50 fein, durch präparative Acrylamid-Disk-Elektrophorese (48) und mit Hilfe der Methode der isoelektrischen Fokussierung (50) angereichert.

Das Nierenrindenhomogenat wurde nach Chandra (8) differentialzentrifugiert (Abb. 17). Dazu wurden 1000 ml des mit 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnten Nierenhomogenats (s.o.) bei 280 g 10 Minuten lang in einer präparativen Ultrazentrifuge (Spinco-L2, Beckman) zentrifugiert. Der Überstand wurde unter gleichen Bedingungen ein zweites Mal zentrifugiert. Das zweite Sediment wurde mit dem ersten vereinigt und mit 0,9%iger Kochsalzlösung auf 1000 ml verdünnt. Nach einer erneuten Homogenisation des zweiten Sediments (nach

Potter) wurde ein drittes Mal bei 280 g (10 Minuten) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde wiederum mit 0,9%iger Kochsalzlösung auf 1000 ml aufgefüllt, homogenisiert und ein weiteres (viertes) Mal zentrifugiert (280 g, 10 Minuten). Die Überstände der vier Zentrifugationen wurden vereinigt und darauf 30 Minuten lang bei 31.550 g zentrifugiert.

Der daraus erhaltene Überstand ($\ddot{U}_4$) konnte durch eine abschließende Zentrifugation (102.900 g - 24 Stunden) in drei Phasen aufgetrennt werden: ein festes Sediment (S_5), eine darüberliegende zähflüssige braune Schicht (LS) und ein klarer Überstand ($\ddot{U}_5$).

Mit Hilfe der Methode der isoelektrischen Fokussierung konnte eine weitere Auftrennung, Anreicherung und Charakterisierung der Nierenrindenangiotensinasen erreicht werden.

Diese von Svensson entwickelte Methode ermöglicht eine Auftrennung von elektrisch geladenen Makromolekülen nach ihren isoelektrischen Punkten (50). In einer vertikal stehenden Trennsäule wird mit Hilfe von Trägerampholyten ein pH-Gradient aufgebaut. Der pH-Wert innerhalb der Säule steigt von der Anode (unten) zur Kathode (oben) kontinuierlich an. Zur Stabilisierung der Trägerampholyte dient ein Zuckergradient. Zur Vermeidung von Konvektionsströmungen und thermischer Zersetzung der biologisch aktiven Substanzen wird die Temperatur mit Hilfe eines inneren und eines äußeren Kühlmantels konstant auf 10° C gehalten. Die zur Trennung, Anreicherung und zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte eingesetzten Proteine bewegen sich so lange im elektrischen Feld, bis sie den ihrem isoelektrischen Punkt entsprechenden pH-Bereich im Gradienten erreicht haben.

B) Chemische Charakterisierung der Angiotensinasen

Die Aktivität verschiedener Angiotensinasen wurde in Abhängigkeit von der Elektrolytzusammensetzung, vom pH-Wert und von der Temperatur des Inkubationsgemisches bestimmt. Mit Hilfe von EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure), Trasylol (der Fa. Bayer, Leverkusen), DFP (Dinitrofluorophosphat), Hg_2Cl_2 , CdCl_2 , CuSO_4 und Plasmin wurde die Hemmbarkeit der Angiotensinasen untersucht. Mit der Methode der isoelektrischen Fokussierung wurden die isoelektrischen Punkte der Angiotensinasen bestimmt.

Zur Ermittlung der Enzymaktivität wurde die Abbaugeschwindigkeit des synthetischen Oktapeptids Hypertensin (Ciba) bzw. von natürlichem Schweineangiotensin mit Hilfe des Angiotensin-Rattentests (siehe unten) gemessen. Das natürliche Angiotensin wurde aus angereichertem Schweine-Angiotensinogen mit Schweine-Renin (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio) in Gegenwart einer ausreichend starken converting enzyme-Aktivität freigesetzt (11). Die Abtrennung des Oktapeptids von den hochmolekularen Proteinen erfolgte über eine Gelfiltration am Sephadex Gel G 25 (10).

C) Nachweis der Angiotensinaseaktivität mit dem Angiotensin-Rattentest

150 g schwere Albinoratten beiderlei Geschlechts wurden durch intraperitoneale Injektion von Inaktin der Fa. Promonta, Hamburg (120 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und der arterielle Druck mit Ansolysen (5 mg/kg Körpergewicht) der Fa. Wyeth Laboratories (USA) auf etwa 80 mmHg gesenkt. Anstelle des Ansolysens wurde bei den ersten Untersuchungen Ecolid der Fa. Ciba (0,1 - 0,2 mg/kg Körpergewicht) verwendet. Der Blutdruck wurde mit Hilfe eines Statham Transducer mit angeschlossenem Druckverstärker (Fa. Hellige) über einen Polyäthylenkatheter in der Arteria

carotis gemessen und mit einem Rikadenki-Schreiber fortlaufend registriert. Die zu testenden Proben wurden in Volumina von 0,01 - 0,1 ml in die Vena jugularis injiziert und mit etwa 0,05 ml 0,9%iger NaCl-Lösung nachgespült.

Das Inkubat bestand in der Regel aus 0,5 ml Probelösung mit der unbekannten Angiotensinaseaktivität und 0,5 ml Hypertensinlösung (40 - 100 ng/ml). Der pH-Wert des Inkubationssystems wurde durch einen Phosphatpuffer (0,03 - 0,05 molar) eingestellt. Für die Blockierungsversuche bestand das Inkubationsvolumen zu je einem Drittel aus angiotensinasehaltiger Lösung, Hypertensin-Ciba (40 - 100 ng/ml und jeweils der Substanz, deren Blockierungsvermögen untersucht werden sollte (EDTA, Trasylol, DFP, Hg_2Cl_2 , CdCl_2 , CuSO_4 , Plasmin). Die einzelnen Komponenten waren jeweils im Phosphatpuffer gelöst.

Bei den Untersuchungen mit Nierenrindenangiotensinasen wurde das Inkubat in einem Schüttelthermostaten inkubiert.

Berechnung der Angiotensinaseaktivität

Die Enzymaktivität wurde so eingestellt, daß der Angiotensin-Abbau innerhalb von 20 Minuten reaktionskinetisch erfaßt werden konnte. Die Hypertensinkonzentration lag weit unterhalb der Substratsättigung des Systems Hypertensin-Erythrozytenangiotensinase, wie aus der Abbildung 2 hervorgeht. In diesem Bereich relativ niedriger Substratkonzentrationen besteht annähernd eine direkte Proportionalität zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit des Angiotensin-Abbaues und der Substratkonzentration (10).

Die Einwirkung der Angiotensinase vermindert die Angiotensinkonzentration ständig, was zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit führt. Dabei gilt für die Reaktionsgeschwindigkeit V des Angiotensin-Abbaues in Abhängigkeit von der Angiotensinaseaktivität $[E]$ bei niedrigen Angiotensinasesubstratkonzentrationen folgende Beziehung (9):

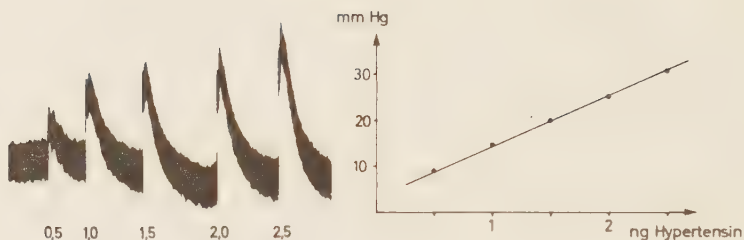


Abb. 1: Hypertensineichung. Links: Druckregistrierung nach Injektion von 0,5 - 2,5 ng Hypertensin-Ciba. Rechts: Graphische Darstellung der Dosis-Wirkungsabhängigkeit. Auf der Abszisse sind die injizierten Hypertensindosen, auf der Ordinate die arteriellen Druckanstiege aufgetragen.

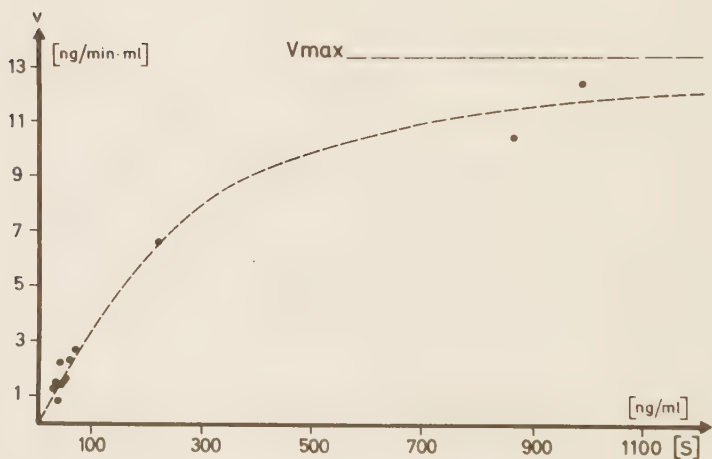


Abb. 2: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit des Angiotensinabbaues von der Angiotensinasesubstratkonzentration (Hypertensin-Ciba) (10).

$$V = - \frac{d [Hy]}{dt} = k \cdot [E] [Hy] \quad (I)$$

$-\frac{d [Hy]}{dt}$ = Geschwindigkeit des Hypertensinabbaus = V

k = Proportionalitätskonstante ($= \frac{K}{K_M}$ (=Reaktionskonstante)
 $= \frac{1}{K_M}$ (=Michaelis-Konstante))

[E] = Angiotensinaseaktivität

[Hy] = Substratkonzentration (Hypertensin-Ciba bzw.
 natürliches Angiotensin).

Durch Umstellung erhält man aus (I):

$$\frac{1}{[Hy]} \cdot \frac{d [Hy]}{dt} = \frac{d \ln [Hy]}{dt} = - k \cdot [E] \quad (II)$$

Die Integration von (II) ergibt:

$$\ln [Hy] = - k \cdot [E] \cdot t + \ln [Hy]_{t=0} \quad (III)$$

$[Hy]_{t=0}$ ist die anfängliche Substratkonzentration. Trägt man die (abnehmende) Substratkonzentration logarithmisch gegen die Inkubationszeit (linear) auf, so sollte sich bei Gültigkeit von (III) daraus eine Gerade ergeben, deren Ordinatenschnittpunkt mit dem Logarithmus der anfänglichen Substratkonzentration $[Hy]_{t=0}$ identisch ist (Abb. 3). Aus dieser Auftragung läßt sich recht einfach die Halbwertszeit ($\tau_{1/2}$) ermitteln, $\tau_{1/2}$ gibt die Inkubationszeit an, die erforderlich ist, um die Substratkonzentration um die Hälfte zu vermindern.

Durch Einsetzen der Halbwertszeit $1/2$ in (III) erhält man:

$$\ln \frac{[Hy]_{t=0}}{2} = - k \cdot [E] \cdot \tau_{1/2} + \ln [Hy]_{t=0} \quad (IV)$$

Durch Umstellung erhält man dann aus (IV):

$$[E] = \frac{\ln 2}{k \cdot \tau_{1/2}} \quad (V)$$

Somit ist die Angiotensinaseaktivität $[E]$ der Halbwertszeit ($\tau_{1/2}$) umgekehrt proportional. Auch die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit V_0 ist der Halbwertszeit umgekehrt proportional. Jedoch ist V_0 daneben von $[Hy]_{t=0}$ abhängig.

Das ergibt sich durch Einsetzen der Gleichung (V) in (I).

$$V_0 = \frac{[Hy]_{t=0} \ln 2}{\tau_{1/2}} \quad (VI)$$

Da V_0 der Angiotensinaseaktivität direkt proportional ist (I), stellt $\frac{V_0}{[Pr]}$ ein Maß für die spezifische Angiotensinaseaktivität $\left[\frac{E}{V_0}\right]$ dar.

$$\frac{V_0}{[Pr]} = \frac{[Hy]_{t=0} \cdot \ln 2}{[Pr] \cdot \tau_{1/2}} = \frac{K \cdot [E] \cdot [Hy]_{t=0}}{[Pr]} \quad (VII)$$

$[Pr]$ = Proteinkonzentration .

Die anfängliche Substratkonzentration betrug in der Regel 40 ng/ml.

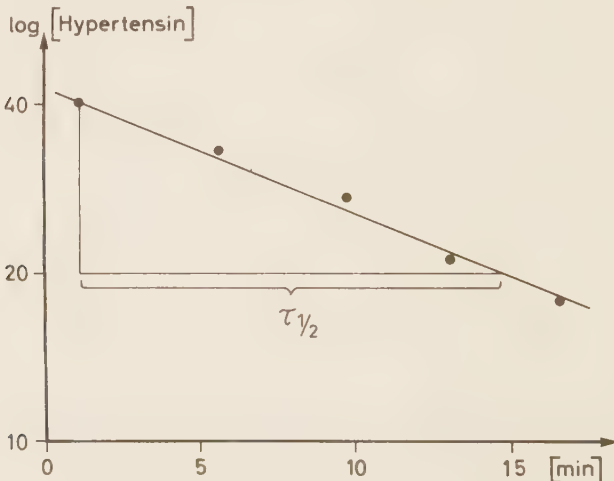


Abb. 3: Halblogarithmische Auftragung des Hypertensinabbaues durch Erythrozytenangiotensinase (Schweinehämolyat: 1 mg/ml). $T = 37^\circ C$; $pH = 6,9$; 0,9%ige NaCl-Lösung (10)

III) Ergebnisse

Zur Aktivitätsbestimmung der Angiotensinase kann Hypertensin-Ciba (α -L-Angiotensin II-Amid) oder ein anderes Angiotensinase-substrat, z.B. natürliches Angiotensin (α -L-Angiotensin II) verwendet werden. Hypertensin-Ciba wurde durch Erythrozyten-angiotensinase vom Schwein etwa 7-mal schneller als natürliches Schweine-Angiotensin (Abb. 4) inaktiviert.

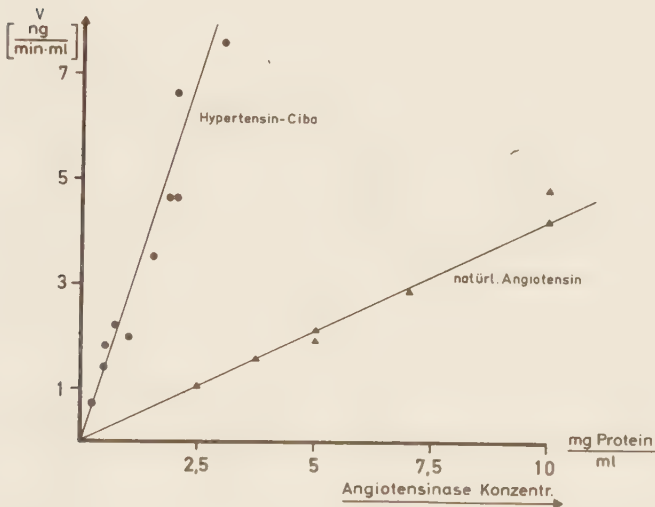


Abb. 4: Abbaugeschwindigkeiten von Hypertensin-Ciba und natürlichem Schweine-Angiotensin (v) in Abhängigkeit von der Erythrozyten-Angiotensinasekonzentration (Hämolysat vom Schwein). $t = 37^\circ \text{C}$; 0,9%ige NaCl-Lösung; pH 6,9; anfängliche Substratkonzentration 40 ng/ml (10).

Das natürliche Angiotensin wurde in ng Hypertensin-Ciba gleicher pressorischer Wirkung angegeben.

Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen des enzymatischen Hypertensin-Abbaues durch verschiedene Angiotensinasen

Um die optimalen Reaktionsbedingungen der Angiotensinasewirkung zu ermitteln, die bei der quantitativen Bestimmung der Angiotensinaseaktivität bekannt sein sollten, wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit des Angiotensinabbaues vom pH und der Temperatur bestimmt. Das Temperaturoptimum lag bei etwa 45° C (Abb. 5).

Eine weitere Voraussetzung für die reaktionskinetische Messung der Angiotensinaseaktivität ist die Kenntnis der Enzymstabilität, welche bei 37° C untersucht wurde. Dazu wurde die Hämolyatlösung in Phosphatpuffer (pH 7) bei 37° C inkubiert und erst nach dieser Vorbehandlung das Angiotensinasesubstrat zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 120 Minuten war die Enzymaktivität der Erythrozytenangiotensinase um etwa 20 - 30% vermindert. Bei Verwendung der gereinigten Erythrozytenangiotensinase I konnte auch nach 40-stündiger Inkubation kein Aktivitätsverlust festgestellt werden (siehe S. 30). Die Inkubation erfolgte in 0,05 molarem Phosphatpuffer von pH 7,0 unter Zusatz von 0,2% Bykomycin (Neomycinsulfat der Fa. Gulden).

Bei der Messung der pH-Abhängigkeit der Angiotensinaseaktivität wurde der pH-Wert des Inkubationsmediums mit 0,02 molearem Phosphatpuffer eingestellt. Das pH-Optimum lag zwischen pH 6,8 und 7,4 (Abb. 6).

Neben Temperatur und pH hat auch die Elektrolytzusammensetzung des Inkubationsmediums Einfluß auf die Aktivität der Erythrozytenangiotensinase. Abb. 7 gibt die Beziehungen zwischen der Angiotensinaseaktivität und der Konzentration von NaCl und KCl in einem pufferfreien Medium wieder. Die Abhängigkeit der Angiotensinaseaktivität von der CaCl_2 -Konzentration ist aus

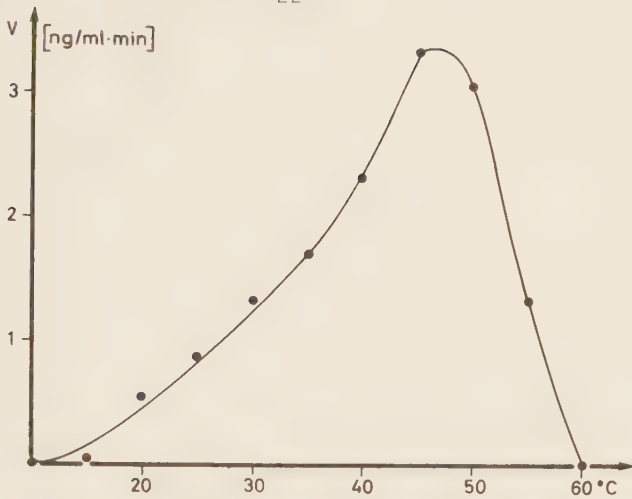


Abb. 5: Temperaturabhängigkeit der Aktivität der Erythrozytenangiotensinase (Schwein). Inkubationsmedium: 0,9%ige NaCl-Lösung; pH 6,9; Enzymkonzentration: 1 mg/ml Hämolysat; anfängliche Substratkonzentration (Hypertensin-Ciba) 40 ng/ml (10).

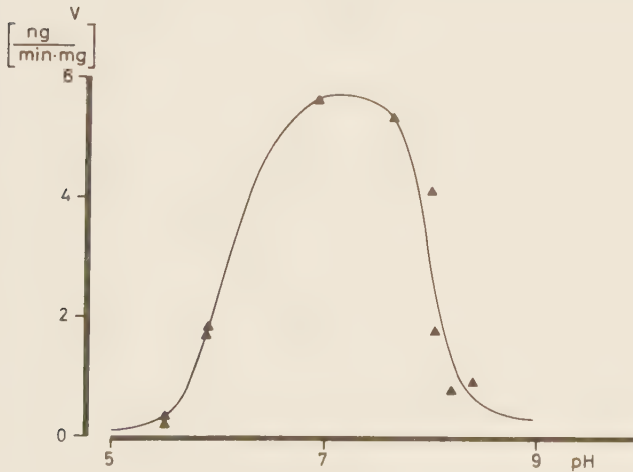


Abb. 6: pH-Abhängigkeit der Aktivität der Erythrozytenangiotensinase (Schwein). $T = 37^{\circ}\text{C}$; Inkubationsmedium: 0,02 M/l Phosphatpuffer; Enzymkonzentration 1 mg/ml Hämolysat; anfängliche Substratkonzentration 40 ng/ml Hypertensin-Ciba (10).

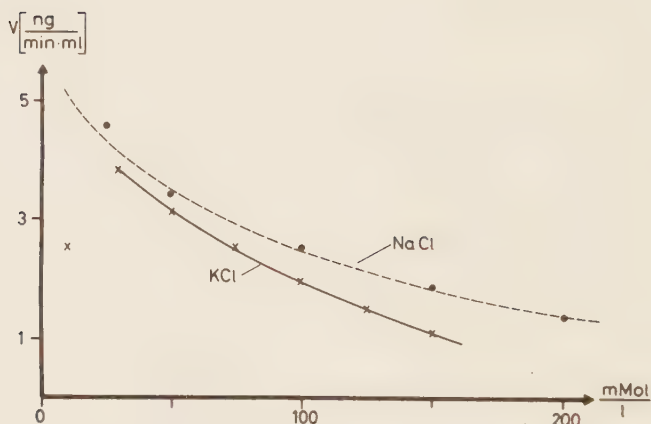


Abb. 7: Aktivität der Erythrozytenangiotensinase (Schwein) in Abhängigkeit von der NaCl- und KCl-Konzentration des Inkubationsmediums. $T = 37^{\circ} \text{C}$; pH 6,9; Enzymkonzentration: 1 mg Hämolytat/ml; anfängliche Substratkonzentration 40 ng/ml Hypertensin-Ciba (10).

der Abb. 8 ersichtlich. Charakteristisch für alle drei Kurven ist das Maximum im niedrigen Konzentrationsbereich und der hyperbelähnliche Abfall zu höheren Konzentrationen hin.

Bei Veränderung der KCl- bzw. CaCl_2 -Konzentration in 0,9%iger NaCl-Lösung verlief die Kurve ab 2 mMol/l parallel zur Abszisse. Bei Ca^{2+} -freier Inkubation war eine vollständige Hemmung der Angiotensinaseaktivität nicht erreichbar. Erst durch Zugabe von EDTA fiel die Angiotensinaseaktivität auf nahezu null ab.

Bei den Versuchen mit CaCl_2 wurde mit den höheren Konzentrationen der pH-Wert stark zum Säuren hin verschoben. Bei 50 mMol/l war deswegen die Reaktionsgeschwindigkeit etwa null.

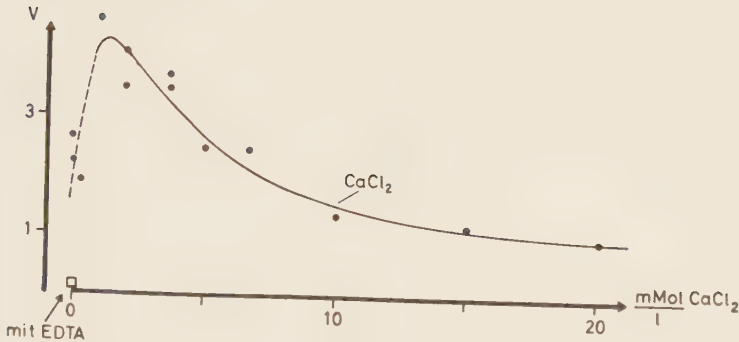


Abb. 8: Angiotensinaseaktivität in Abhängigkeit von der CaCl_2 -Konzentration in pufferfreiem Medium. $T = 37^\circ \text{C}$; Enzymkonzentration 1 mg HämolySAT/ml; anfängliche Substratkonzentration 40 ng/ml (10).

Erythrozytenangiotensinasen

1. Blockierung:

Durch CdCl_2 und Hg_2Cl_2 ließ sich die Erythrozytenangiotensinase vollständig blockieren. Bei 2 mMol/l CdCl_2 ebenso wie in 1/3-gesättigter Hg_2Cl_2 -Lösung war keine Angiotensinaseaktivität mehr nachweisbar. Diese Versuche wurden in 0,9%iger NaCl-Lösung durchgeführt (Abb. 9).

Die Aktivität der Erythrozytenangiotensinase wurde auch durch Plasmin* gehemmt. Schon bei einer Plasminkonzentration von 0,23 IE/ml im Inkubat wurde der Hypertensinabbau

*Gereinigtes Schweineplasmin wurde uns freundlicherweise von Herrn Professor Dr.med. Marx, I. Medizinische Universitätsklinik München, zur Verfügung gestellt.

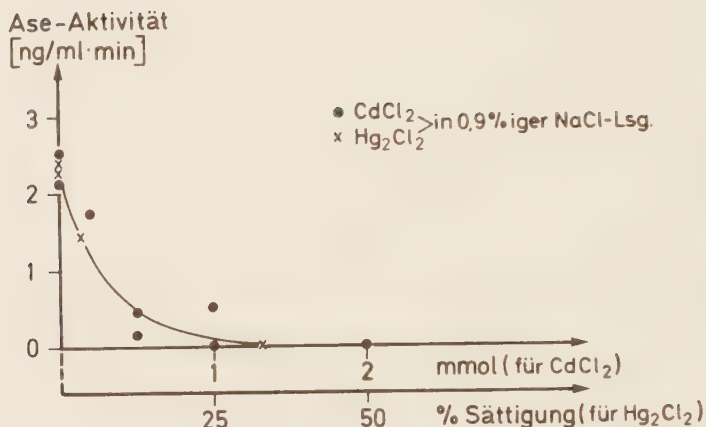


Abb. 9: Blockierung der Erythrozytenangiotensinase durch verschiedene Konzentrationen von CdCl_2 und Hg_2Cl_2 ; $T = 37^\circ \text{C}$; pH 6,9; Substrat- und Enzymkonzentrationen siehe Abb. 7 (10).

um den Faktor 9,3, bei 1,16 IE Plasmin /ml um das 12-fache vermindert (Abb. 10). Da die Versuche in 0,9%iger NaCl-Lösung ohne Puffer durchgeführt wurden, verschob sich der pH-Wert durch die Plasminzugabe von pH 6,9 nach pH 7,23 bzw. 7,38. Diese pH-Verschiebung kann aber nicht den verlangsamten Abbau verursacht haben, da die pH-Abhängigkeit der Angiotensinaseaktivität in diesem Bereich ein Plateau bildet (siehe Abb. 6).

Bei späteren Versuchen mit einer anderen Plasminpräparation war die Blockierungswirkung nicht so stark geprägt. Die Angiotensinaseaktivität wurde nur auf die Hälfte reduziert, obwohl die Plasminkonzentrationen höher gewählt waren (3 IE/ml). Die Inkubationszeit war jedoch nur 1/6 so lang wie bei

den ersten Versuchen. Möglicherweise war das zuletzt eingesetzte Plasmin bereits teilweise inaktiviert.

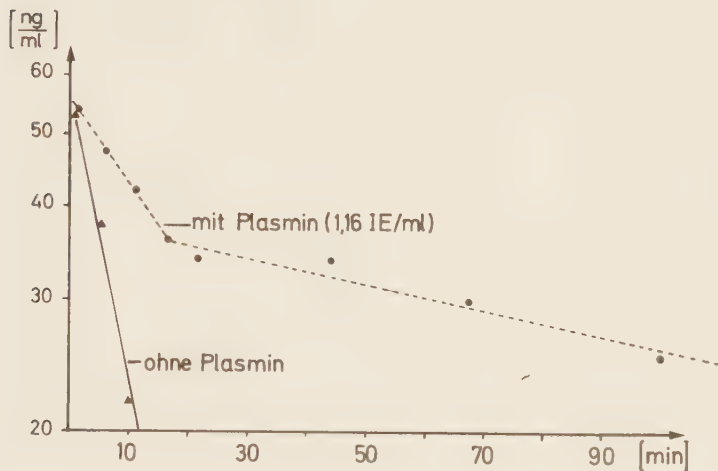


Abb. 10: Angiotensinaseaktivität in Gegenwart von Plasmin; Enzymkonzentration 2 mg Schweinehämolytats/ml; $T = 37^{\circ} \text{C}$; pH 7,38 mit Plasmin, 6,9 ohne Plasmin; in 0,9%iger NaCl-Lösung.

2. Anreicherung:

Die günstigste Anreicherung wurde für die Erythrozytenangiotensinase durch eine Sephadex-Gel-Filtration an dem Gel G 50 fein erzielt.

Dazu wurden 200 mg des gefriergetrockneten Hämolytats (Schwein) auf ein unter 5°C gekühltes Sephadex-Chromatographierohr K 25/100 ($\varnothing$ 2,5 cm, $l = 100$ cm) aufgegeben, und die Säule mit destilliertem Wasser eluiert. Das Ergebnis dieser Gel-Filtration ist aus der Abb. 11 zu ersehen. Es

ließen sich 2 Maxima der Enzymaktivität nachweisen. Das erste erschien im proteinarmen Vorlauf, das zweite im Nachlauf. Mit der Gel-Filtration an G 50 ließ sich die Angiotensinase gegenüber der Ausgangsaktivität im gefriergetrockneten Hämolysat um den Faktor 7 (2. Maximum) bzw. 12 (1. Maximum) präparativ anreichern.

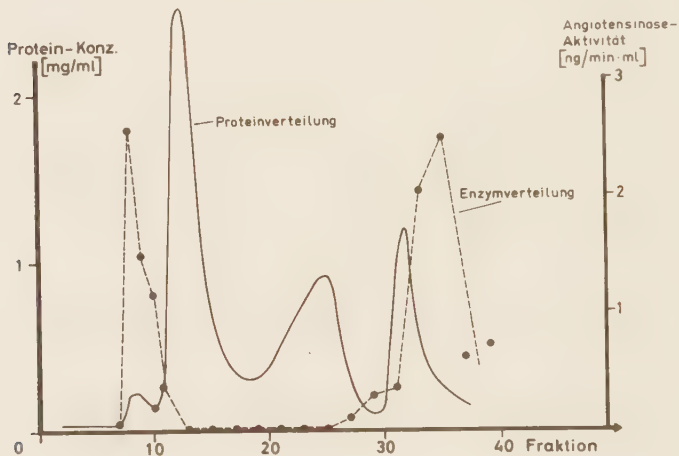


Abb. 11: Aktivitätsverteilung der Erythrozytenangiotensinasen am Sephadex-Gel G 50. Trennröhr: $\varnothing = 2,5$ cm, $l = 100$ cm. Volumen pro Fraktion: 10 ml. Angiotensinase-nachweis mit Hypertensin-Ciba (10).

Es wurden auch Gelfiltrationen mit 0,3%iger NaCl-Lösung als Elutionsmittel gemacht. Auch auf diese Weise wurde die Angiotensinaseaktivität in zwei Maxima aufgetrennt, die jedoch näher am Proteingipfel lagen, so daß in diesem Fall nur ein geringerer Anreicherungseffekt erzielt werden konnte. Die zuerst eluierte Angiotensinase (Ase I) wurde mit der von

L. Strauch entwickelten präparativen Acrylamid-Disk-Elektrophorese weiter angereichert, wobei das Protein hauptsächlich in zwei Banden aufgetrennt wurde, dessen letztere die gesamte Angiotensinaseaktivität enthielt (Abb. 12).

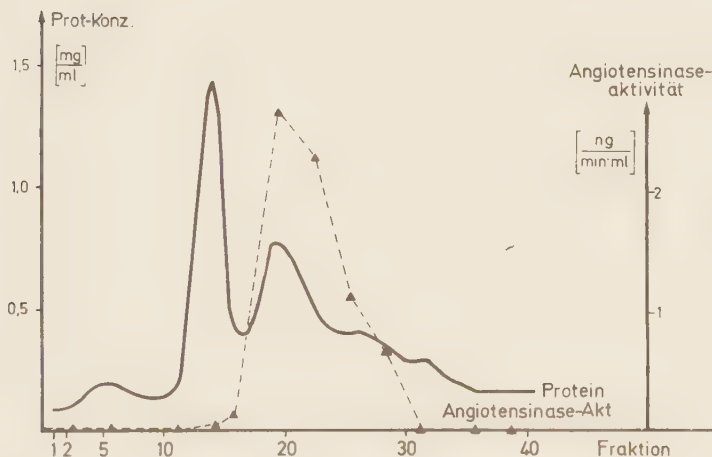


Abb. 12: Aktivitätsverteilung der Erythrozytenangiotensinase (I) beim präparativen Acrylamid-Disk-Elektrophoreseverfahren. Ausgangsmaterial: Erstes Aktivitätsmaximum (Ase I) der Sephadex Gelfiltration an G 50. Volumen pro Fraktion: 5 ml. Inkubationsmedium: 0,05 M/l Phosphatpuffer vom pH 7,0 anfängliche Substratkonzentration (Hypertensin-Ciba) 40 ng/ml.

Charakterisierung der durch Sephadex-Gelfiltration aufgetrennten Angiotensinasen (I und II)

Die pH-Abhängigkeit der Aktivität der Angiotensinase I zeigt ein Maximum um pH 7 (Abb. 13). Im Vergleich zur Angiotensinase II ist dieses Enzym sehr beständig. Nach 40 Stunden Vorinkubation bei 37° C konnte unter Antibiotikenschutz (0,2% Neomycinsulfat) kein meßbarer Aktivitätsverlust festgestellt werden (Abb. 15). Das Temperaturoptimum der Angiotensinase I lag bei 50° C. Oberhalb 55° C wurde dieses Enzym irreversibel inaktiviert (Abb. 14).

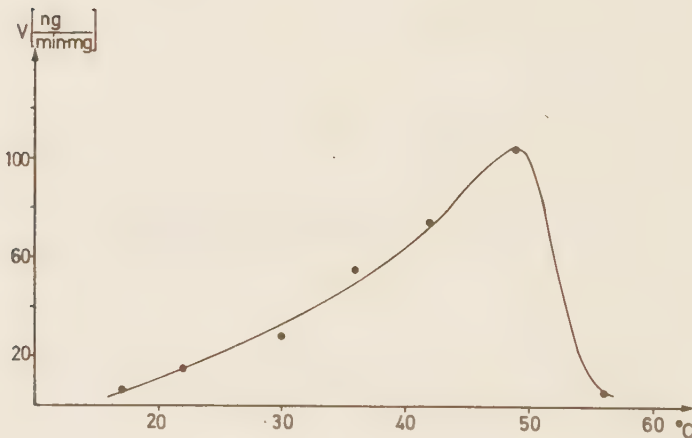


Abb. 13: pH-Abhängigkeit der Aktivität der Erythrozytenangiotensinase I; T = 37° C in 0,02 Mol/l Phosphatpuffer; anfängliche Substratkonzentration 40 ng/ml Hypertensin-Ciba; Enzymkonzentration: 0,1 mg/ml angereicherte Angiotensinasepräparation.

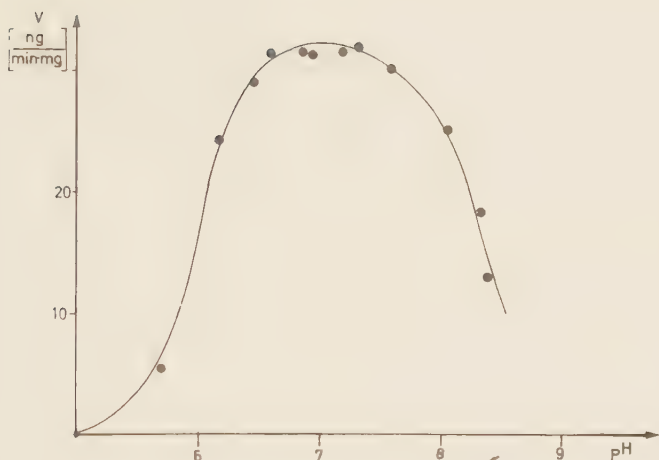


Abb. 14: Temperaturabhängigkeit der Aktivität der Erythrozyten-angiotensinase I in 0,02 Mol Phosphatpuffer; pH 7,0; anfängliche Substratkonzentration 40 ng/ml Hypertensin-Ciba. Enzymkonzentration: 0,1 mg/ml angereicherte Angiotensinasepräparation (G 50).

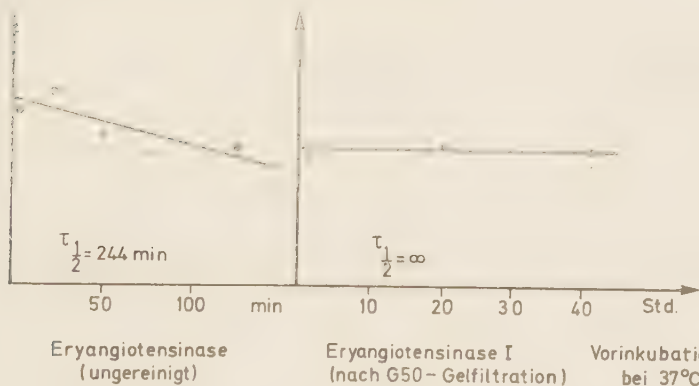


Abb. 15: Beständigkeit der Erythrozytenangiotensinase bei 37° C in 0,9%iger NaCl-Lösung (mit 0,2% Bykomycin). Angiotensinasekonzentration: 2 mg/ml Hämolyolat bzw. 0,2 mg/ml Ase I; pH 7,2.

Als isoelektrischer Punkt wurde für die Erythrozytenangiotensinase I 3,9 ermittelt. Das Maximum der Angiotensinaseaktivität lag an der aufsteigenden Flanke des ersten Proteingipfels.

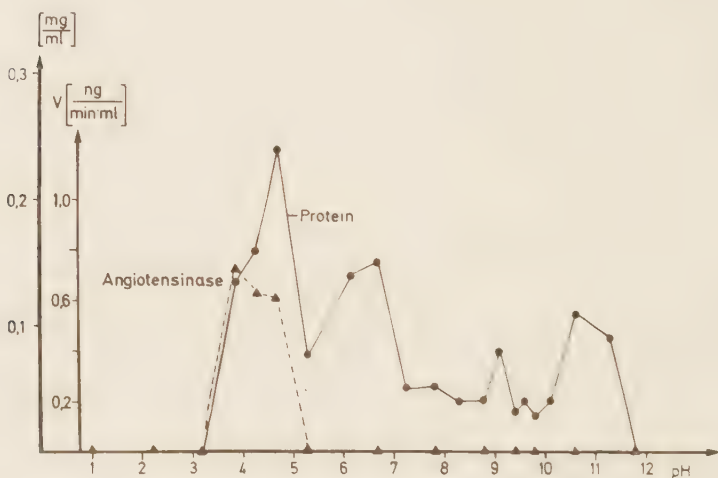


Abb. 16: Isoelektrische Fokussierung der Erythrozytenangiotensinase I; pH-Gradient pH 3 - 10.

Die bei einer Gelfiltration am Gel G 50 hinter dem Proteingipfel erscheinende Angiotensinase II erwies sich als ziemlich unbeständig. Selbst in getrocknetem Zustand verringerte sich die Enzymaktivität bei Zimmertemperatur innerhalb weniger Stunden so sehr, daß eine weitere Anreicherung bislang nicht möglich war. Das Temperaturoptimum lag bei 32° C. Eine Erwärmung des Enzyms auf 40° C verminderte die Aktivität bereits um 60% innerhalb von 10 Minuten. Zu ihrer Wirksamkeit benötigte diese Angiotensi-

nase II Kalziumionen in höherer Konzentration als die Angiotensinase I.

In Abwesenheit von Kalziumionen ließ sich die Angiotensinase II nicht nachweisen. Es war nicht bei allen Anreicherungsversuchen möglich, die Angiotensinase II wieder aufzufinden.

3. Angiotensinasewirkung gewaschener Erythrozyten:

Um die Wirkung der Erythrozytenangiotensinase unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurden 4-mal mit 0,9%iger NaCl-Lösung von 4° C gewaschene Erythrozyten mit Hypertensin-Ciba bei 37° C inkubiert. Der Hämatokrit der Erythrozytensuspension war dabei 4%. Unter diesen Bedingungen war die Angiotensinasewirkung der Erythrozytensuspension ebenso stark wie die des Plasmas, was nicht als Folge einer Hämolyse erklärt werden kann, da in der letzten Waschlösung (0,9% NaCl-Lösung) keine Angiotensinasewirkung nachweisbar war.

Nierenrindenangiotensinasen

Ungeachtet seiner extrarenalen Funktion stellt die Niere wohl das Haupterfolgsorgan des Renin-Angiotensin-Systems dar. Da die juxtaglomerulären Zellen der Nierenrinde das angiotensinbildende Enzym Renin enthalten, kommt den im Nierencortex lokalisierten Angiotensinasen für das intrarenale Angiotensinfließgleichgewicht besondere Bedeutung zu. Daher befaßt sich der folgende Abschnitt mit der Auftrennung und Charakterisierung dieser Enzyme.

1. Differentialzentrifugation:

Um eine möglichst schonende Auftrennung der Nierenrindenangiotensinasen zu erreichen, wurde Schweinenierenrinde (Feuchtgewicht 200 g) eines Tieres unter Kühlung (0 - 4° C) homogenisiert und anschließend in Anlehnung an die von

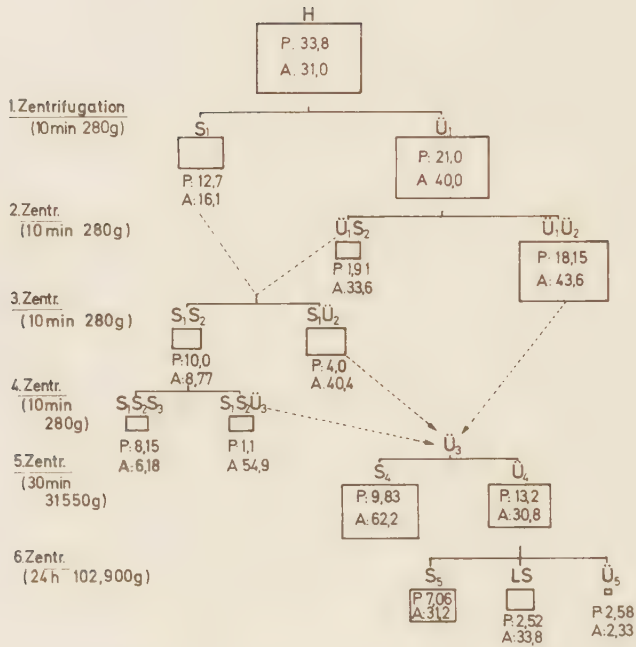


Abb. 17: Angiotensinaseverteilung nach Ultrazentrifugation von Schweinenierenrinden-Homogenat nach Chandra (8).
 H = Homogenat aus Schweinenierenrinde
 Ü = Überstand, S = Sediment, P = Proteingehalt (in Gramm Trockengewicht), A = spezifische Angiotensinase-aktivität (Abbaurrate) in $\frac{\text{ng Hypertensin}}{\text{mg Protein} \cdot \text{min}}$.
 Die Größe der Rechtecke gibt den Angiotensinasegehalt der jeweiligen Fraktion wieder.

Chandra angegebene Methode fraktioniert ultrazentrifugiert (8).

Bei der ersten Zentrifugation (10 Minuten, 280 g) erschienen 20% der Angiotensinaseaktivität des Homogenats im Sediment, 80% wurden im Überstand gefunden, der 62% des gesamten Proteins enthielt. Daraus läßt sich für den Überstand $\ddot{U}_1$ eine Anreicherung der Angiotensinaseaktivität um den Faktor 1,3 berechnen. Nach Wiederholung dieser Zentrifugation (10 Minuten, 280 g) wurde für den Überstand $\ddot{U}_1\ddot{U}_2$ eine weitere geringe Anreicherung der Angiotensinaseaktivität um den Faktor 1,1 erreicht. Die gesammelten Niederschläge der beiden ersten Zentrifugationen wurden mit 0,9%-iger NaCl-Lösung auf 1 l aufgefüllt, nach Potter homogenisiert und erneut für 10 Minuten bei 280 g zentrifugiert. Dabei erschienen 60% der Angiotensinaseaktivität von S_1 und $\ddot{U}_1S_1$ im Überstand ($S_1\ddot{U}_2$), der jedoch nur 29% des Proteins enthielt. Die spezifische Angiotensinaseaktivität des Überstands betrug 40,4 ng/mg, die des Sediments (S_1S_2) 8,77 ng/mg. Letzteres wurde ebenso wie die Niederschläge S_1 und $\ddot{U}_1S_2$ erneut zentrifugiert (10 Minuten, 280 g). Ähnlich wie beim dritten Zentrifugengang erschien auch beim vierten der Hauptanteil des Proteins (81,5%) im Sediment ($S_1S_2S_3$), während die Angiotensinaseaktivität auf beide Fraktionen ($S_1S_2S_3$ und $S_1S_2\ddot{U}_3$) ziemlich gleichmäßig verteilt war (48% : 52%). Im Laufe des Verfahrens nahm die spezifische Angiotensinaseaktivität in den Niederschlägen (S_1 , S_1S_2 , $S_1S_2S_3$) immer mehr ab. In den Überständen $\ddot{U}_1\ddot{U}_2$, $S_1\ddot{U}_2$, $S_1S_2\ddot{U}_3$) wurde dagegen eine Anreicherung der Angiotensinase erreicht. Die gesammelten Überstände ($\ddot{U}_3 = \ddot{U}_1\ddot{U}_2 + S_1\ddot{U}_2 + S_1S_2\ddot{U}_3$) enthielten ca. 95% der Ausgangsenzymaktivität. Sie wurden darauf bei 31.550 g 30 Minuten lang zentrifugiert. Das dabei gewonnene Sediment (S_4) und der Überstand ($\ddot{U}_4$) wurden näher charakterisiert.

2. Blockierungsversuche der durch Ultrazentrifugation aufgetrennten Angiotensinasen:

Zunächst wurde die Blockierbarkeit mit EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure), DFP (Dinitrofluorophosphat), Trasylol und Hg_2Cl_2 untersucht. Im Inkubationsgemisch war die Konzentration von EDTA 6,6 mg/ml, die von Trasylol 1666 KIE/ml (Kallikreininhibitoreinheiten/ml). DFP und Hg_2Cl_2 waren im Inkubationsgemisch jeweils in $\frac{1}{3}$ gesättigter Lösung vorhanden. In der Abb. 18 ist die Blockierung der Angiotensinaseaktivität in Prozenten der Ausgangsangiotensinaseaktivität angegeben. Es wurde nachträglich eine Abhängigkeit der Angiotensinaseblockierung von der Konzentration der blockierenden Substanzen aufgenommen. Diese ergab, daß die Konzentrationen der Angiotensinaseblocker so hoch gewählt waren, daß dabei die maximale Blockierung erreicht wurde (unveröffentlichte Befunde von Dr. H. Dahlheim). Ein Vergleich der Angiotensinaseblockierung des Überstands $\bar{U}_4$ mit dem Sediment S_4 zeigte ähnliches Verhalten gegenüber EDTA, DFP und Hg_2Cl_2 . Dagegen vermochte Trasylol die Angiotensinaseaktivität des Überstandes 4-mal stärker zu blockieren als die des Sediments. Bei Kombination von EDTA und DFP addierten sich die Blockierungseffekte etwa. Bei gleichzeitiger Gegenwart von EDTA und Trasylol wurde ein additives Verhalten nur bei den S_4 -Angiotensinasen beobachtet, während bei den $\bar{U}_4$ -Angiotensinasen die durch Trasylol bewirkte Blockierung nur in geringem Maße verstärkt wurde.

Eine vollständige Blockierung der Angiotensinasen war auch bei gleichzeitiger Verwendung von EDTA, DFP und Trasylol nicht zu erreichen. Maximal konnten nur 87% der Angiotensinaseaktivität in Anwesenheit von EDTA (3,3 mg/ml), DFP (gesättigte Lösung) und Trasylol (833 KIE/ml) erreicht werden.

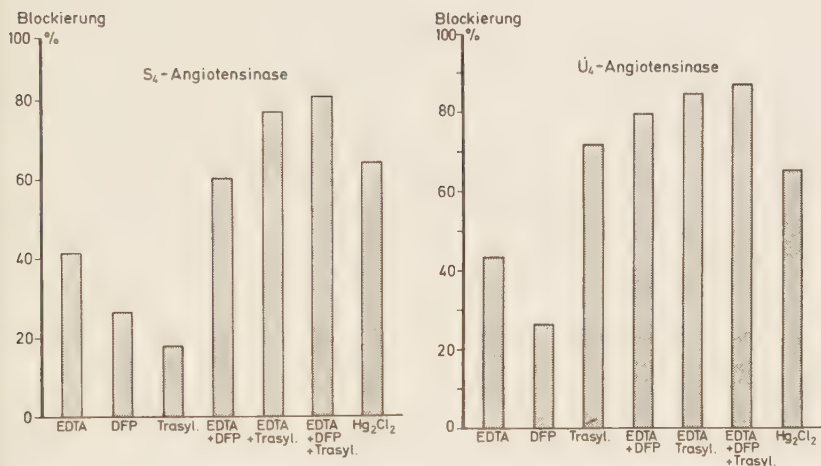


Abb. 18: Hemmbarkeit der S₄- und U₄-Angiotensinasen (s. Abb. 17) durch EDTA, DFP, Trasylol und Hg₂Cl₂. Konzentration der blockierenden Substanzen im Inkubationsgemisch: EDTA 6,6 mg/ml, Trasylol 1666 KIE/ml, DFP und Hg₂Cl₂ jeweils in gesättigter Lösung. T = 37° C; pH 7,0.

Blockierungsversuche mit CuSO₄:

Eine besonders starke Inaktivierung der Nierenrinden- und Erythrozytenangiotensinasen war mit CuSO₄ zu erreichen. Eine 1-millimolare Lösung dieses Salzes reduzierte bei Verwendung von Hypertensin-Ciba die U₄-Angiotensinaseaktivität um 97%. Die S₄-Angiotensinasen wurden zu 85%, die LS-Angiotensinasen zu 92% und die Erythrozytenangiotensinasen zu 95,6% blockiert. Der pH-Wert des Inkubationsgemisches war jeweils 7,2 ± 0,05 (eingestellt mit 0,1 molarem Phosphatpuffer), die Temperatur 37° C. Untersuchungen mit Schweinerenin und homo-

logem Substrat haben gezeigt, daß mit einer 1-millimolaren CuSO_4 -Lösung auch die Angiotensinbildung um über 90% vermindert wird, so daß dieses Salz zur Eliminierung der Angiotensinasen bei der Reninaktivitätsbestimmung als nicht besonders geeignet erscheint.

Blockierung der LS (Granula)-Angiotensinasen mit Plasmin:
Da mit Plasmin die Enzymaktivität der Erythrozytenangiotensinase stark zu reduzieren war, wurde auch der Einfluß von Plasmin auf die LS-Angiotensinase untersucht. Die Angiotensinaseaktivität dieser Fraktion wurde durch 10 IE Schweineplasmin/ml um 43,5% vermindert.

3. pH-Abhängigkeit des Hypertensin-Abbaues nach Blockierung mit EDTA bzw. Trasylol:

Bei der weiteren Zentrifugation des Überstandes $\bar{U}_4$ bei 102.900 g (24 Stunden) entstanden drei Fraktionen: Ein festes Sediment (S_5), ein klarer Überstand ($\bar{U}_5$) und eine dazwischenliegende trübe Schicht fest-flüssiger Konsistenz, die von Chandra "Liquid pellet" (LS) benannt wurde. In der letztgenannten Fraktion wurde von Chandra die höchste Reninaktivität gefunden und elektronenmikroskopisch Granula identifiziert (8). Die Angiotensinaseaktivität der sechsten Zentrifugation (102.900 g) verteilte sich wie folgt auf die drei Phasen: 66,5% im Sediment, 31,8% im Liquid Sediment und 1,7% im Überstand. Letzterer enthielt nur etwa 0,5% der Ausgangsangiotensinaseaktivität (H) und konnte deshalb nicht weiter untersucht werden. Bei den übrigen Endfraktionen ($S_1S_2S_3$, S_4 , S_5 und LS) wurde der durch Angiotensinase katalysierte Hypertensinabbau in Abhängigkeit vom pH gemessen. Durch Zusatz des Chelatbildners EDTA und des Proteinaseinhibitors Trasylol wurde das pH-Verhalten des Hypertensin-Abbaues deutlich verändert.

a) Die Angiotensinasen des Überstands ($S_1S_2S_3$):
Ohne Zusatz einer blockierenden Substanz lag das pH-Optimum zwischen pH 7,6 und 8. Möglicherweise ist die breite Basis der Kurve auf das Vorhandensein mehrerer Angiotensinasen in dieser Fraktion zurückzuführen. In Gegenwart von Trasylol wurden zwei pH-Optima (bei pH 7,0 und 7,8) gemessen. Durch den Proteinaseinhibitor Trasylol wurde vor allem der Gipfel zwischen pH 7,0 und 9,0 erniedrigt. Die Basis der Kurve wurde dadurch nicht verändert.

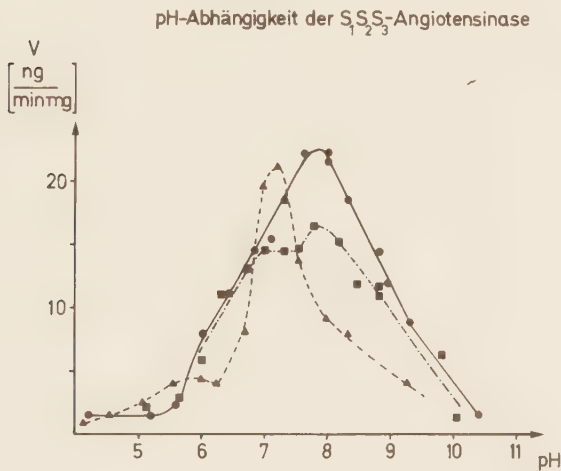


Abb. 19: Reaktionsgeschwindigkeit des Hypertensinabbaues durch die $S_1S_2S_3$ -Angiotensinasen in Abhängigkeit vom pH. Ausgezogene Kurve: ohne Blockierung; gestrichelte Kurve: mit 3,3 mg EDTA/ml; Strichpunkt-kurve: mit 3333 KIE Trasylol/ml. $T = 37^{\circ}C$, 0,05 Mol Phosphatpuffer.

EDTA blockierte dagegen im basischen Bereich. Das beim

Trasylo1 aufgetretene pH-Optimum bei pH 7,0 erschien jetzt deutlicher, während das bei pH 7,8 nicht mehr nachweisbar war.

b) S_4 -Angiotensinasen:

Die Angiotensinasefraktion S_4 hatte ein pH-Optimum bei pH 7,3. Der Kurvenverlauf zeigte zum Sauern hin, zwischen pH 6,4 und 5,6 eine starke Abnahme, während der Abfall im Basischen nicht so steil war (pH 8,0 - 10,3).

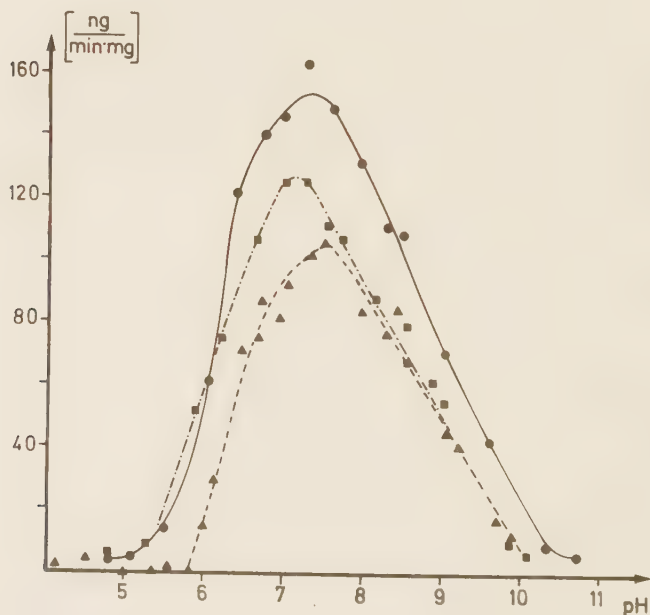


Abb. 20: Reaktionsgeschwindigkeit des Hypertensin-Abbaues durch S_4 -Angiotensinase in Abhängigkeit vom pH. Ausgezogene Kurve: ohne Blockierung; gestrichelte Kurve: mit 3,3 mg EDTA/ml; Strichpunktcurve: mit 3333 KIE Trasylo1/ml. $T = 37^{\circ} \text{C}$; 0,05 Mol Phosphatpuffer.

Mit Trasylol im Inkubationsmedium wurde die Kurve vor allem im basischen Bereich etwas erniedrigt.

In Anwesenheit von EDTA war auch die Blockierung auf der sauren Seite stärker ausgeprägt.

c) S_5 -Angiotensinasen:

Das pH-Optimum der unblockierten S_5 -Angiotensinasen lag bei pH 7,3. Der Kurvenverlauf zeigte zum Säuren und Basischen hin einen gleichartigen Aktivitätsabfall.

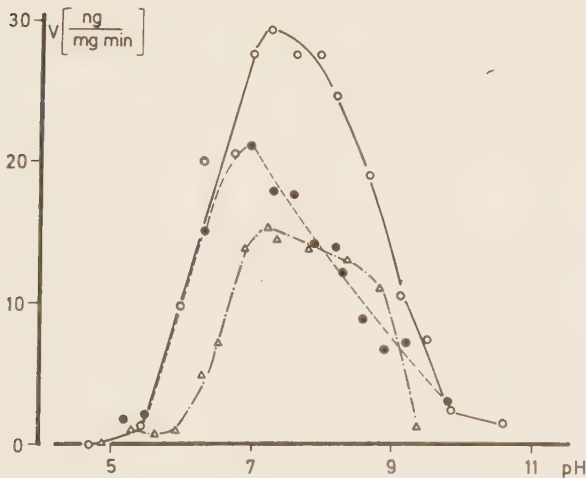


Abb. 21: Reaktionsgeschwindigkeit des Hypertensin-Abbaues durch S_5 -Angiotensinase in Abhängigkeit vom pH. Ausgezogene Kurve: ohne Blockierung; Strichpunkt-kurve: mit 3,3 mg EDTA/ml; gestrichelte Kurve: mit 3333 KIE Trasylol/ml. $T = 37^{\circ}C$; 0,05 Mol Phosphat-puffer.

Durch Trasylol konnte eine Blockierung nur oberhalb pH 6,8 erreicht werden. Das pH-Optimum wurde zum Säuren hin

verschoben (pH 7,0). In Anwesenheit von EDTA wurde die Gesamtkurve verschmälert, so daß ein Angiotensinabbau nur zwischen pH 6 und 9,3 meßbar war.

d) LS-Angiotensinasen:

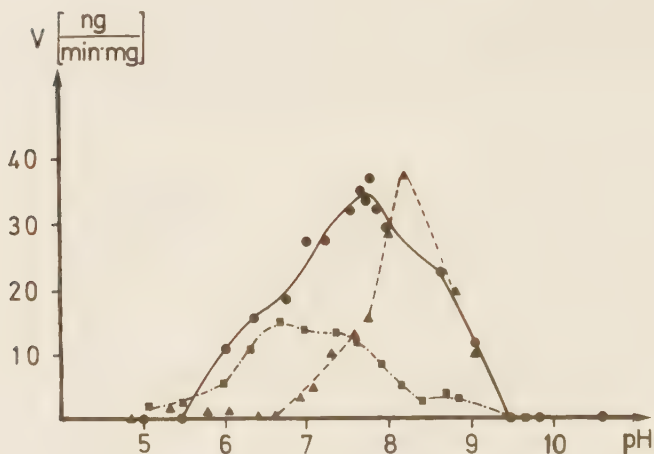


Abb. 22: Reaktionsgeschwindigkeit des Hypertensin-Abbaues durch die LS-Angiotensinasen in Abhängigkeit vom pH. Ausgezogene Kurve: ohne Blockierung; gestrichelte Kurve: mit 3,3 mg EDTA/ml; Strichpunktcurve: mit 3333 KIE Trasylol/ml; $T = 37^{\circ} \text{C}$; 0,05 Mol Phosphatpuffer.

Das pH-Optimum dieser Angiotensinasen lag bei pH 7,7.

Trasylol hemmte vor allem im Bereich oberhalb pH 6,8 (ähnlich wie bei den S_5 -Angiotensinasen).

EDTA inaktivierte dagegen die unter pH 8,0 wirksamen Angiotensinasen.

Der Vergleich der S_4 -Angiotensinasen mit den S_5 - und LS-angiotensinasen zeigte die wesentlich stärkere Blockierung der letzteren durch Trasylol, was auch für die Blockierungsversuche galt (siehe Abb. 18). Die S_5 - und LS-Angiotensinasen sind nämlich im letzten Zentrifugengang aus den $\ddot{U}_4$ -Angiotensinasen abgetrennt.

Trasylol inhibierte die Angiotensinaseaktivität aller vier untersuchten Zentrifugenfraktionen am besten im Bereich zwischen pH 7 und 9.

Nicht so einheitlich war der Blockierungseffekt bei Anwendung von EDTA. Während bei den $S_1S_2S_3$ -Angiotensinasen die maximale Blockierung um pH 6,4 und um pH 7,6 erfolgte, wurde sie bei den S_4 -Angiotensinasen zwischen pH 6 und 8 erreicht. Lediglich die S_5 - und LS-Fraktion zeigten ähnliches Verhalten bei EDTA-Zugabe: die maximale Blockierung der Angiotensinasen wurde zwischen pH 6,8 und 7,8 erreicht.

4. Auftrennung und Bestimmung des isoelektrischen Punktes mit Hilfe der Methode der isoelektrischen Fokussierung:
Aufgrund der Blockierungsversuche mit EDTA und Trasylol bei verschiedenen pH-Werten und von den Literaturbefunden her war zu vermuten, daß mehrere Angiotensinasen in der Nierenrinde vorkommen. Mit dem Verfahren der isoelektrischen Fokussierung war nicht nur die Trennung, sondern auch die Bestimmung der isoelektrischen Punkte der verschiedenen Angiotensinasen möglich. Der isoelektrische Punkt der $S_1S_2S_3$ -Angiotensinasen lag bei pH 4,3. Ein weiteres sehr niedriges Maximum wurde bei pH 3,2 ermittelt.

Die isoelektrischen Punkte der S_4 -Angiotensinasen lagen bei pH 4,15 und pH 8,3.

Die isoelektrischen Punkte der S_5 -Angiotensinasen lagen bei pH 3,0 und 4,5.

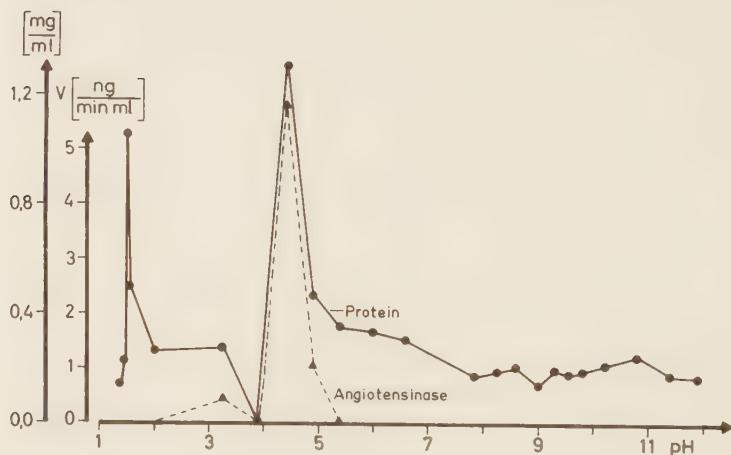


Abb. 23: Elektrofokussierung der $S_1S_2S_3$ -Fraktion (pH-Gradient: pH 3 - 10); Ausgangsproteinmenge: 100 mg Trockengewicht; ausgezogene Kurve: Proteinverteilung; gestrichelte Kurve: Angiotensinaseverteilung.

Die $S_1S_2S_3$ -, S_4 - und S_5 -Fraktionen wurden mit Trägerampholyten getrennt, deren pH-Werte von 3 - 10 reichten. Die Elektrofokussierung der LS-Fraktion wurde darüberhinaus mit Trägerampholyten durchgeführt, deren pH-Werte zwischen pH 4 und 6 lagen.

Dadurch wurde eine Trennung des ursprünglich einheitlichen Angiotensinasegipfels erreicht. Die isoelektrischen Punkte lagen bei pH 4,4 und pH 4,8. Da der Trennsäulinhalt in Fraktionen zu je 5 ml aufgeteilt wurde, scheinen die Angiotensinmaxima, die jeweils nur in einer Fraktion gefunden wur-

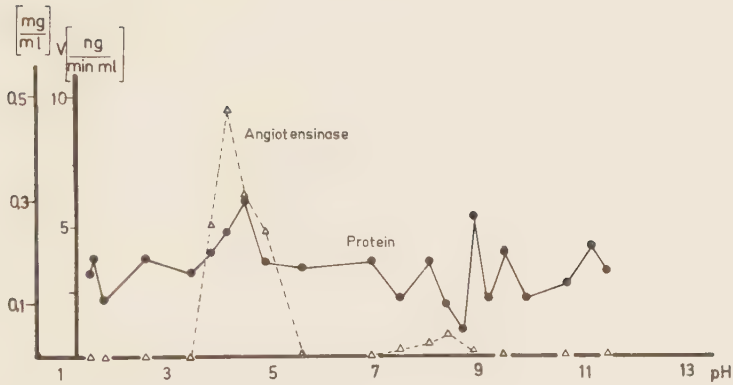


Abb. 24: Elektrofokussierung der S₄-Fraktion. (pH-Gradient: pH 3 - 10); Ausgangsproteinmenge: 20 mg; ausgezogene Kurve: Proteinverteilung; gestrichelte Kurve: Angiotensinaseverteilung.

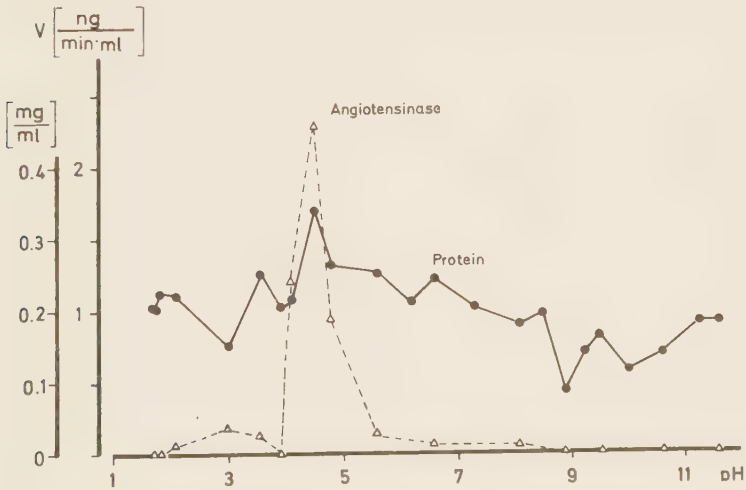


Abb. 25: Elektrofokussierung der S₅-Fraktion. (pH-Gradient: pH 3 - 10); Ausgangsproteinmenge: 20 mg; ausgezogene Kurve: Proteinverteilung; gestrichelte Kurve: Angiotensinaseverteilung.

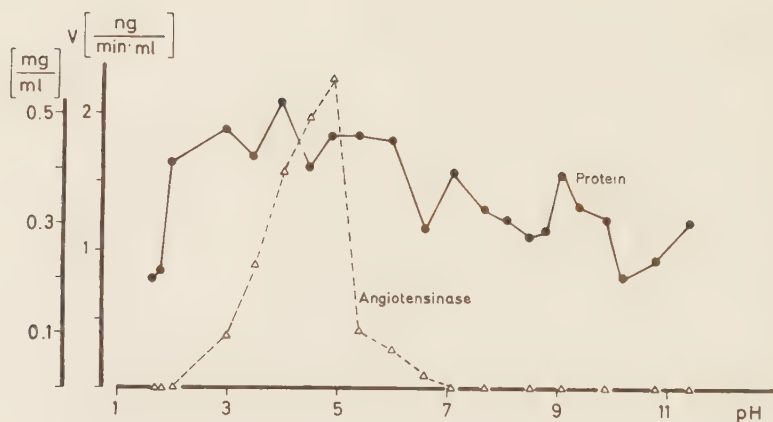


Abb. 26: Isoelektrische Fokussierung der LS-Fraktion. (pH-Gradient: pH 3 - 10); Ausgangsproteinmenge: 20 mg; ausgezogene Kurve: Proteinverteilung; gestrichelte Kurve: Angiotensinaseverteilung.

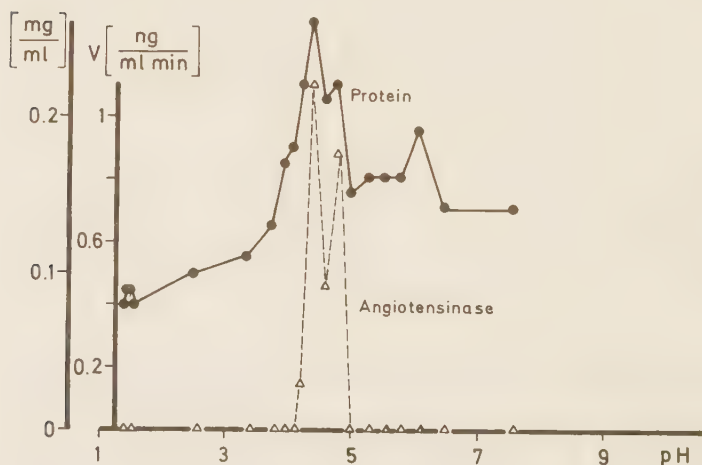


Abb. 27: Elektrofokussierung der LS-Fraktion. (pH-Gradient: pH 4 - 6); Ausgangsproteinmenge: 20 mg; ausgezogene Kurve: Proteinverteilung; gestrichelte Kurve: Angiotensinaseverteilung.

den, wenig gesichert. Bei zweimaliger biologischer Testung waren jedoch die Angiotensinasemaxima beide Male nachzuweisen.

Die pH-Werte der gesammelten Fraktionen beim kleinen Gradienten (pH 4 - 6) unterschieden sich nur um je 0,2 pH-Einheiten voneinander, so daß die isoelektrischen Punkte hier auf 0,1 pH-Einheit genau angegeben werden können. Beim großen Gradienten (pH 3 - 10) betrug der pH-Unterschied im Trennbereich (pH 3 - 10) 0,4 - 0,5 pH-Einheiten.

Es ist, wie das Beispiel der LS-Fraktion zeigte, auch möglich, daß bei Anwendung eines kleineren pH-Gradienten zunächst einheitliche Angiotensinasemaxima in mehrere aufgetrennt werden können. Weitere Versuche mit kleinen pH-Gradienten müssen diesen Sachverhalt klären.

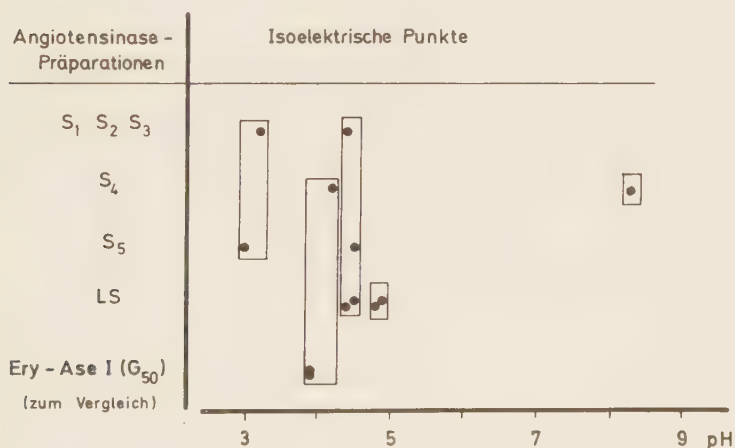


Abb. 28: Vergleich der isoelektrischen Punkte der Nierenrindenangiotensinasen und der Erythrozytenangiotensinase I.

Aufgrund der ermittelten isoelektrischen Punkte lassen sich die Nierenangiotensinasen in fünf Gruppen einteilen:

1. Die $S_1S_2S_3$ - und S_5 -Fraktionen enthalten beide eine Angiotensinase mit dem isoelektrischen Punkt (IP) um pH 3,1 (3,0 und 3,2).
2. Die S_4 -Fraktion hat eine Angiotensinase mit dem IP bei pH 4,15 und insofern Ähnlichkeit mit der Erythrozytenangiotensinase I (IP 3,9).
3. Im pH-Bereich 4,4 - 4,5 finden sich isoelektrische Punkte der $S_1S_2S_3$ -, S_5 - und der LS-Fraktion.
4. Die LS-Fraktion zeigt beim pH 4,9 einen isoelektrischen Punkt, der in anderen Fraktionen nicht gefunden wird. Allerdings zeigt die Abb. 25 (S_5 -Angiotensinasen), daß die Fraktion bei pH 4,84 noch viel Angiotensinaseaktivität enthält. Möglicherweise ist diese Aktivität auf eine andere Angiotensinase als auf die mit IP 4,5 zurückzuführen, was Elektrofokusserversuche mit Hilfe eines kleineren Gradienten zeigen müßten.
5. Die S_4 -Fraktion enthält eine Angiotensinase mit dem isoelektrischen Punkt 8,3. In anderen Fraktionen erscheint keine Angiotensinase, die diesen IP hat.

Die Elektrofokusserversuche lassen vermuten, daß die Nierenrinde mindestens fünf verschiedene Angiotensinasen enthält.

IV) Diskussion

Die in der Literatur beschriebenen Bestimmungsmethoden für die Angiotensinase beruhen im wesentlichen auf drei verschiedenen Prinzipien:

1. Quantitative chemische Bestimmung der Spaltprodukte des Angiotensinabbaues (30, 38);
2. Verwendung von solchen synthetischen Substraten (z.B. Naphthylamidderivate), deren Abbau spektralphotometrisch meßbar ist (36, 39, 56);
3. Verfolgung des Angiotensinabbaues über den arteriellen Druckanstieg im Rattentest (1, 10, 15, 29, 35, 42).

Zu 1: Die Spaltprodukte des Angiotensinabbaues werden entweder papierchromatographisch (30) oder durch Koppelung an einen DPNH-abhängigen optischen Test bestimmt (38). Beide Methoden sind an lange Inkubationszeiten gebunden, da verhältnismäßig viel Substrat umgesetzt werden muß, bevor ein quantitativer Nachweis der Spaltprodukte möglich ist. Dadurch fällt die spontane Inaktivierung des Enzyms stärker ins Gewicht als bei kurzen Inkubationszeiten. Besonders schwierig ist die Angiotensinasebestimmung bei der Verwendung von angereicherten, aber nicht reinen natürlichen Substraten, da auch Spaltprodukte der begleitenden inerten Proteine bei dieser Methode analytisch mit erfaßt werden können. Beide Methoden beschränken sich auf die Bestimmung der N-terminal wirksamen Angiotensinasen.

Zu 2: Auch bei der Verwendung von Naphtylamidderivaten als Angiotensinasesubstrat werden nur die Aminopeptidasen erfaßt. Zwar bilden Aminopeptidasen im Plasma eines Gesunden den Hauptanteil der Angiotensinasen. Ob das jedoch auch für pathologische Zustände gilt, ist noch ungewiß.

Unter physiologischen Bedingungen scheinen die Amino-peptidasen keinen entscheidenden Anteil am Angiotensinabbau zu haben. So konnten Biron und Mitarbeiter, die die Angiotensininaktivierung im Lungen-, Leber-, Nieren- und Beinkreislauf untersuchten, keinen signifikanten Unterschied feststellen, wenn statt α -L-Angiotensin II das am Aminoende veränderte β -L-Angiotensin II verwendet wurde (3). Gerade das müßte man jedoch erwarten, wenn Amino-peptidasen im Körper eine Hauptrolle im Angiotensinabbau spielen würden; denn β -L-Angiotensin II wird vom Plasma sehr viel langsamer gespalten als die α -Verbindung (42).

Zu 3: Die quantitative Bestimmung der Angiotensinase durch direkte Messung der Abnahme der pressorischen Aktivität bedingt niedrige Ausgangskonzentrationen des Substrats, da der empfindliche Meßbereich beim Angiotensinratten-test zwischen 10 und 50 ng/ml liegt. Bei diesen niedrigen Substratkonzentrationen ist für die Ermittlung der Enzymaktivität die sich fortlaufend verringernde Substratkonzentration zu berücksichtigen. Eine prozentuelle Angabe des erfolgten Substratabbaues, wie sie von verschiedenen Autoren als Maß für die Enzymaktivität benutzt wird, erlaubt noch keine exakte quantitative Aussage über die Höhe der Angiotensinaseaktivität (15, 29, 42, 43, 44, 59). Eine bessere Möglichkeit, die Angiotensinaseaktivität zu messen, stellt die Bestimmung der Halbwertszeit des Angiotensinabbaues dar (35). Diese ist umgekehrt proportional zur Enzymaktivität. Bei dem hier beschriebenen Verfahren wird aus der reaktionskinetisch ermittelten Halbwertszeit die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit V_0 errechnet, die der Angiotensinasekonzentration direkt proportional ist.

Der Befund, daß sich die Abbaugeschwindigkeit von Hypertensin-CIBA und natürlichem Angiotensin bei Inkubation mit Erythro-

zytenangiotensinase wie 1 : 7 verhält, stimmt mit Ergebnissen anderer Autoren überein, die Angiotensinasen aus Plasma und Nierenhomogenat untersuchten (38, 42). In dieser Hinsicht bestehen also keine prinzipiellen Unterschiede zwischen Angiotensinasen verschiedener Herkunft. Diese Einheitlichkeit der Befunde spricht dagegen, daß eine Imitierung der physiologischen Funktion des natürlichen Angiotensins durch Verwendung des synthetischen Hypertensins möglich ist.

Die allgemein verwendete Inkubationstemperatur von 37° C erweist sich für den Nachweis der Angiotensinaseaktivität als recht günstig, da die Reaktionsgeschwindigkeit bei dieser Temperatur für relativ kurze Inkubationszeiten (ca. 20 Minuten) ausreicht. Für diesen Zeitraum kann auch die spontane Inaktivierung der Angiotensinase gegenüber dem biologischen Meßfehler vernachlässigt werden. Die Inkubation bei Temperaturen oberhalb 37° C ist wegen der thermischen Inaktivierung der Erythrozytenangiotensinase ungünstig.

Neben dem Temperaturverhalten ist die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH ein weiteres wichtiges Charakteristikum. Das im Bereich um pH 7 ermittelte Optimum der Erythrozytenangiotensinaseaktivität fällt mit dem physiologischen pH in den Erythrozyten zusammen. Khairallah und Mitarbeiter fanden für Serum- und Erythrozytenangiotensinase dasselbe pH-Optimum und vermuteten, daß das in den Erythrozyten vorkommende Enzym mit einer Angiotensinase des Plasmas identisch ist (29).

Bei der Untersuchung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der NaCl-, KCl- und CaCl₂-Konzentration zeigte sich für alle Elektrolyte ein gleichartiges, charakteristisches Verhalten. Der im Bereich der höheren Elektrolytkonzentrationen gemessene hyperbelartige Abfall der Enzymaktivität (s. Abb. 7) mag darauf beruhen, daß das für diese Reaktion benötigte Wasser mit ansteigender Salzkonzentration infolge der zunehmenden Hydratisierung in geringerem Maße zur Verfügung steht. Im un-

teren Konzentrationsbereich muß die Abhängigkeit dann auf eine andere Ursache zurückgeführt werden. Die durch die unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen bedingte Löslichkeitsbeeinflussung der Reaktionskomponenten könnte hierbei vielleicht eine Rolle spielen. Zwischen den Abhängigkeiten im NaCl- und dem KCl-haltigen Medium wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (12). Auch die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der CaCl_2 -Konzentration zeigt ein gleichartiges Verhalten. Da von verschiedenen Autoren angegeben wird, daß die Abbaureaktion nur in Gegenwart von Ca^{++} abläuft, haben wir die Ca^{++} -Konzentration in einer 0,9%-igen Kochsalzlösung variiert. Dabei wurde eine Konstanz der Enzymaktivität festgestellt. Die von uns beobachtete vollständige Hemmung der Erythrozytenangiotensinase durch EDTA in einer Konzentration von 3 mg/ml stimmt mit den Untersuchungen anderer Autoren überein, die auch die Serumangiotensinasen damit ausschalten konnten (15, 29, 38, 59). Die Erythrozytenangiotensinase ließ sich von uns bei Benutzung von bidestilliertem Wasser ohne EDTA nicht vollständig ausschalten. Es ist daher anzunehmen, daß möglicherweise mit dem dialysierten Hämolysat noch Kalzium in das Inkubationsgemisch eingeschleppt wurde.

Herr Professor Marx machte uns auf eine mögliche Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems durch Plasmin aufmerksam. Die vorliegende Arbeit bestätigt diese Annahme. Neben einer starken Hemmung der Erythrozytenangiotensinasen wird auch die Aktivität der LS-Angiotensinasen der Nierenrinde abgeschwächt. Weitere Angiotensinasepräparationen konnten wegen der begrenzten Menge des zur Verfügung gestellten Plasmins nicht untersucht werden. Itskovitz untersuchte auch den Effekt von Plasmin auf das Renin-Angiotensin-System (26). Er beschrieb, daß es Angiotensin nicht abbaut. Da es sich beim Plasmin um eine Proteinase (Fibrinolysin) handelt, wäre eine inaktivierende Wirkung auf Angiotensin nicht verwunderlich gewesen. Daß es

jedoch im Gegenteil den Angiotensinabbau durch Hemmung der Angiotensinasen verhindert, erschien uns zunächst unwahrscheinlich. Bei Betrachtung der Reaktionskinetik nach Plasminzusatz (s. Abb. 10) fällt auf, daß die Angiotensinabbau-geschwindigkeit erst allmählich abnimmt. Das kann entweder darauf beruhen, daß der "Angiotensinaseinhibitor" Plasmin eine geringe Affinität zur Erythrozytenangiotensinase hat oder darauf, daß Plasmin die Angiotensinase zerstört. Letzteres ist bei der "Proteinase" Plasmin gut vorstellbar. Ob die Angiotensinase-inaktivierung reversibel ist, wurde von uns noch nicht untersucht.

Versuche mit Renin und Reninsubstrat zeigten, daß Plasmin auf diese Reaktion auch bei einer Versuchsdauer von 2 Stunden keine Wirkung hat.

Um die biologische Bedeutung der Erythrozytenangiotensinase bei intakten Erythrozyten nachzuweisen, wurden gewaschene Erythrozyten mit Hypertensin inkubiert. Die dabei ermittelte Halbwertszeit für Hypertensin betrug etwa 20 Sekunden. Wenn natürliches Angiotensin 7-mal langsamer inaktiviert wird, wie aus unseren Untersuchungen und denen anderer Autoren hervorgeht, errechnet sich daraus eine biologische Halbwertszeit von 140 Sekunden für natürliches Angiotensin II (38, 42).

Hodge und Mitarbeiter fanden im Kreislauf des Hundes für natürliches Angiotensin II eine biologische Halbwertszeit von 183 Sekunden (24). Diese Überlegungen sprechen für die Bedeutung der Erythrozytenangiotensinase zur Aufrechterhaltung des Angiotensinfließgleichgewichts.

Nierenangiotensinasen

Anders als im Plasma und im Hämolysat, wo die Angiotensinasen in löslicher Form vorliegen, hat sich bei unseren Versuchen mit Nierenrindenhomogenat gezeigt, daß sich die hier lokalisierten Angiotensinasen unter unseren Reaktionsbedingungen

nur zum Teil in Lösungen bringen lassen. Daher war bei der Zentrifugation (bei 31.500 und 102.000 g) der weitaus größte Teil der Angiotensinasen in den Niederschlägen zu finden. Auch durch Ultrabeschallung konnten aus diesen Niederschlägen keine Angiotensinasen in die lösliche Form übergeführt werden. Wachsmuth konnte durch pH-Fällung, Toluolbehandlung und Trypsininkubation eine strukturgebundene Nierenangiotensinase freisetzen, deren Molekulargewicht 280.000 betrug (52). Sie war thermostabil bis 65° C und hatte ein pH-Optimum von 7 - 7,3. Durch 50%-igen Äthylalkohol konnte diese Angiotensinase denaturiert werden. Da die Nierenangiotensinasen mit hoher Wahrscheinlichkeit strukturgebunden vorkommen, darf angenommen werden, daß ihre Wirksamkeit im Wesentlichen auf dieses Organ beschränkt bleibt und sie möglicherweise in die Regulation der Nierendurchblutung eingreifen. Da durch die Homogenisation die in der Zelle liegenden Enzyme frei werden, stellt sich die Frage, ob die gemessene Angiotensinasekonzentration ein tatsächliches Bild von der Angiotensinasewirkung in der Niere wiedergibt. Durch Perfusionsuntersuchungen an intakten Nieren konnte bei einer Nierenpassage ein Angiotensinverlust von etwa 75% gefunden werden (24, 34). Diese Methode erlaubt jedoch keine Charakterisierung der am Abbau beteiligten Angiotensinasen, da das Perfusat sich den physiologischen Bedingungen (pH, Ionenzusammensetzung) angleichen muß. Nur in vitro-Untersuchungen lassen eine so weitgehende Charakterisierung der Enzyme zu, nämlich die Aktivität auch bei extremen Änderungen von pH, Temperatur und Ionenzusammensetzung zu messen. Dazu ist es jedoch nötig, die verschiedenen Enzyme voneinander zu trennen. Im Falle der Nierenangiotensinasen war eine Auftrennung wegen der schlechten Löslichkeit dieser Enzyme erschwert. Lediglich durch Differentialzentrifugation läßt sich ein Auftrenneffekt erzielen. Daneben wurde versucht, die einzelnen Angiotensinasen durch Blockierung zu charakterisieren. Die von Wachsmuth beschriebene Methode, durch Toluol- und Trypsinbehandlung eine Angiotensinase in die lösliche Form über-

zuführen, könnte auch die Eigenschaften des betreffenden Enzyms verändern. Es ist deshalb sehr schwierig, so ein zutreffendes Bild vom Wirkungsmechanismus der Nierenangiotensinasen zu erhalten. Durch Zentrifugation bei 31.550 g gelingt es, die Nierenangiotensinasen in zwei große Gruppen zu trennen. Sie unterscheiden sich bei Verwendung verschiedener blockierender Substanzen deutlich voneinander, obwohl es sich bei beiden Fraktionen um wahrscheinlich an Partikel gebundene Angiotensinasen handelt. Hg_2Cl_2 zeigte bei einer Konzentration von 30% Sättigung eine Blockierung, die sowohl bei der Ü_4 -Ase als auch bei der S_4 -Ase etwa 65% betrug. Wegen der geringen Löslichkeit dieses Salzes ist die Quecksilberkonzentration bei den gewählten Bedingungen sehr niedrig. Ein besser lösliches Salz ist das HgCl_2 , welches Itskovitz zur Blockierung der Nierenangiotensinase verwendete (25, 26). Er injizierte HgCl_2 und homogenisierte danach das Nierenrindengewebe. Dabei fand er einen Angiotensinaseverlust von etwa 60%. Diesen führte er auf eine Zerstörung von Tubuluszellen zurück, die er histologisch nachweisen konnte. Die von ihm verwendete Quecksilberionenkonzentration und damit Blockierung der Angiotensinase genügte aber, den Aktivitätsverlust zu erklären.

Der Umstand, daß selbst durch Kombination verschiedener blockierender Substanzen keine vollständige Ausschaltung der Nierenangiotensinase möglich war, muß bei der Eliminierung der Angiotensinasen zur Reninbestimmung beachtet werden.

Blockierungsversuche bei verschiedenen pH-Werten:

Die Blockierungsversuche mit EDTA und Trasylol bei verschiedenen pH-Werten haben gezeigt, daß die durch Zentrifugation gewonnenen Nierenrindenfraktionen mehrere Angiotensinasen enthalten. Durch Trasylol werden die bei pH 7,3 - 8,4 optimal wirksamen Angiotensinasen inaktiviert. Ihr Anteil an der Gesamtangiotensinaseaktivität ist besonders groß in der LS- und S_5 -Fraktion. Diese Fraktionen enthalten die Mikrosomen, die

erst über 100.000 g sedimentieren. Da Trasylol eine Spezifität für Endopeptidasen besitzt (28), legen die Versuche nahe, daß vor allem in den Mikrosomen die endopeptisch wirksamen Angiotensinasen vorliegen. Diese Enzyme finden sich jedoch auch in der $S_1S_2S_3$ - und S_4 -Fraktion, wenn auch mit geringerem Anteil an der Gesamtangiotensinaseaktivität. Der Chelatbildner EDTA inaktiviert die Angiotensinasen, die Ca^{++} oder andere zweiwertige Metallionen (Co^{++} , Ni^{++} , Zn^{++}) zur Wirksamkeit benötigen. Es handelt sich dabei vorwiegend um am Aminoende angreifende Angiotensinasen (23, 29, 31, 52, 59). Sie sind auf die Zentrifugenfraktionen der Nierenrinde unregelmäßig verteilt. Sie scheinen in keinem pH-Bereich bevorzugt wirksam zu sein. Die durch EDTA blockierbaren S_4 - und S_5 -Angiotensinasen sind über den pH-Bereich von 5,5 - 9,0 verteilt. In der $S_1S_2S_3$ -Fraktion sind diese Enzyme vor allem im Basischen, in der LS-Fraktion nur unter pH 8 wirksam.

Wachsmuth und Mitarbeiter fanden in der Mikrosomenfraktion von Schweinenierenhomogenat eine am Aminoende angreifende Angiotensinase mit einem pH-Optimum von 7,0 - 7,3 (52). Sie war durch EDTA blockierbar. Durch Ca^{++} konnte die Angiotensinaseaktivität wiederhergestellt werden. Bei dem von uns gewählten Zentrifugationsverfahren befinden sich die Mikrosomen in der S_5 - bzw. LS-Fraktion. Die Angiotensinasen dieser Fraktionen ließen sich auch in unseren Untersuchungen bei EDTA-Zugabe am besten zwischen pH 6,8 und 7,5 blockieren. Es könnte sich also bei der blockierten Angiotensinase um die von Wachsmuth beschriebene handeln. Wachsmuth fand zusammen mit Kurz in späteren Untersuchungen, daß die von ihm beschriebene Schweinenierenangiotensinase höchstwahrscheinlich mit einer im Schweineplasma vorkommenden Angiotensinase identisch ist (31). Dieses Plasmaenzym war auch durch EDTA blockierbar, und immunoelektrophoretisch nicht vom Nierenenzym zu unterscheiden.

Zwanzig und Oelkers fanden im menschlichen Plasma eine Angio-

tensinase mit ähnlichen Eigenschaften (59). Sie hatte ein pH-Optimum von 7,2 und war durch EDTA blockierbar. Durch Ca^{++} konnte die Blockierung rückgängig gemacht werden.

Elektrofokussierung:

Bei der isoelektrischen Fokussierung zeigten sich mindestens fünf verschiedene Angiotensinaseaktivitäten in der Nierenrinde. Die Versuche wurden meist mit Trägerampholyten durchgeführt, die einen großen pH-Bereich (pH 3 - 10) erfaßten. Wie sich am Beispiel der LS-Fraktion zeigen ließ, ist es bei Anwendung eines kleineren Gradienten (pH 4 - 6) möglich, eine schärfere Trennung der verschiedenen Enzyme zu erreichen. Bei optimaler Ausnutzung dieser Methode ist es möglich, Eiweißkörper voneinander zu trennen, deren isoelektrische Punkte sich nur um 0,02 pH-Einheiten voneinander unterscheiden. Weitere Versuche müssen zeigen, ob sich noch mehr verschiedene Nierenangiotensinasen auftrennen lassen.

V) Zusammenfassung

In fast allen Organen des tierischen Organismus lassen sich Enzyme nachweisen, die Angiotensin abbauen (Angiotensinasen). In der vorliegenden Arbeit wurden an der Spezies Schwein neben den leicht zugänglichen Erythrozytenangiotensinasen die Nierenrindenangiotensinasen untersucht. Als Angiotensinase-substrat fand vor allem synthetisches Hypertensin-CIBA Anwendung. Die Enzymaktivität wurde im biologischen Test an der Ratte bestimmt. Es wird eine Methode angegeben, aus der Halbwertszeit des Hypertensin-Abbaus die Angiotensinaseaktivität zu errechnen. Mit Hilfe eines Gel-Filtrationsverfahrens am Sephadex Gel G 50 wurden zwei Erythrozytenangiotensinasen aufgetrennt, die beide mit EDTA, CdCl_2 und Hg_2Cl_2 vollständig, mit Trasylol und Plasmin partiell blockierbar waren. Während die eine Erythrozytenangiotensinase auch bei tagelanger Inkubation bei 37°C keine Aktivität verlor, war die andere sehr instabil.

Im Gegensatz zu den gut wasserlöslichen Erythrozytenangiotensinasen waren die Nierenangiotensinasen nur zum Teil in Lösung zu bringen. Mit Hilfe einer Differentialzentrifugation (nach Chandra (8)) wurden fünf Fraktionen getrennt. Die höchste Angiotensinasekonzentration und -menge fand sich in der Mitochondrienfraktion (Sediment der Zentrifugation bei 31.550 g), die niedrigste im partiellen Überstand. Auch in der Fraktion mit dem höchsten Reningehalt fand sich ein hoher Angiotensinaseanteil. Da die weitere Auftrennung mit den üblichen Trennmethode(n) (Gelfiltration, Elektrophorese u.a.) durch die schlechte Wasserlöslichkeit der Nierenangiotensinasen erschwert war, wurden pH-Abhängigkeiten unter Verwendung blockierender Substanzen zur Charakterisierung herangezogen: Sämtliche Nierenangiotensinasen hatten pH-Optima zwischen pH 6 und 10. Unter Trasyloleinfluß wurden vor allem Angiotensinasen zwischen pH 7 und 9, mit EDTA vor allem Angiotensinasen zwischen pH 6 und

8 blockiert. Mit dem Verfahren der isoelektrischen Fokussierung wurden mindestens 5 Nierenangiotensinasen voneinander getrennt.

VI) Literatur

1. Berger, M., J. Langhans:
Angiotensinase activity in pregnant and nonpregnant women.
Amer.J.Obstet.Gynecol. 98, 215 (1967)
2. Biron, P., R. Landesmann, J.C. Hunt:
Plasma angiotensinase activity in human hypertension.
Nature 204, 1096 (1964)
3. Biron, P., P. Meyer, J.C. Panisset:
Removal of angiotensin from the systemic circulation.
Can.J.Phys.Pharm. 46, 175 (1968)
4. Bock, K.D., F. Gross:
Venendruckänderungen nach Gabe von Renin, Angiotensin und Noradrenalin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 242, 188 (1961)
5. Bock, K.D., H.J. Krecke, H.M. Kuhn:
Untersuchungen über die Wirkung von synthetischem Hypertensin II auf Blutdruck, Atmung und Extremitätendurchblutung des Menschen.
Klin.Wschr. 36, 254 (1958)
6. Braun-Mendendez, E., J.C. Fasciolo, L.F. Leloir, J.M. Munoz:
The substance causing renal hypertension.
J.Physiol. (London) 98, 283 (1940)
7. Brunner, G., J. Sommer, R. Kattermann:
Über das Verhalten der sogenannten Leucinaminopeptidase im Serum unter Verwendung verschiedener Substrate.
Klin.Wschr. 46, 541 (1968)
8. Chandra, S., F.R. Skelton, L.L. Bernardis:
Separation of renal pressor activity by ultracentrifugation.
Laboratory Investigation 13, 1192 (1964)
9. Dahlheim, H., P. Granger, K. Thureau:
A sensitive method for determination of renin activity in the single juxtaglomerular apparatus of the rat kidney.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 321, 303 (1970)
10. Dahlheim, H., K. Petschauer, K. Thureau:
Anreicherung und Charakterisierung der Erythrozytenangiotensinase.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 305, 105 (1969)
11. Dahlheim, H., P. Weber, I. Herold, K. Thureau:
Untersuchungen über präparative Anreicherungsmöglichkeiten des Reninsubstrats (Angiotensinogen).
Pflügers Arch.ges.Physiol. 298, 131 (1967)

12. Dahlheim, H., P. Weber, K. Petschauer, K. Thureau:
Das enzymatische Bildungs- und Abbauverhalten des Angiotensins in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Inkubationsmediums.
VI Symp. der Gesellschaft f. Nephrologie, Wien, September 1968, Wien: Verlag d. Wiener Medizinischen Akademie 1969
13. Dahlheim, H., P. Weber, K. Thureau:
Untersuchungen über die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Angiotensinbildung in vitro in Abhängigkeit von der elektrolytischen Zusammensetzung des Inkubationsmediums.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 310, 137 (1969)
14. Dahlheim, H., P. Weber, P. Walter, J. Rosenthal:
Vergleichende reaktionskinetische Untersuchungen mit standardisiertem menschlichen Renin an vier angereicherten tierischen Reninsubstraten.
Pflügers Arch.ges.Physiol. 317, 344 (1970)
15. Dauda, G.:
Angiotensinase activity in blood plasma of the rat.
Acta Physiol.Acad.Scient.Hung. 34, 37 (1968)
16. Dengler, H., G. Reichel:
Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation der Renin- und Hypertensinase-Aktivität.
Experientia 16, 36 (1960)
- 16a. Feldberg, W., G.P. Lewis:
The action of peptides on the adrenal medulla. Release of adrenaline by bradykinin and angiotensin.
J.Physiol. 171, 98 (1964)
- 16b. Feldberg, W., G.P. Lewis:
Further studies on the effects of peptides on the supra-renal medulla of cats.
J.Physiol. 178, 239 (1965)
17. Genest, J., W. Nowaczynski, E. Koiw, T. Sandor, P. Biron:
Adreno-cortical function in essential hypertension.
In: Essential hypertension. An Internat.Symposion ed. by K.D. Bock and P.T. Cottier.
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960
18. Goldblatt, H., J. Lynch, R.F. Hanzal, W.W. Summerville:
Studies on experimental hypertension I.
J.Exp.Med. 59, 347 (1934)
19. Haas, E., H. Goldblatt, L. Lewis:
Inhibition of angiotensin and its protection by a cofactor in blood.
Amer.J.Physiol. 215, 1420 (1968)

20. Helmer, O.M.:
Effector in plasma, that enhances contraction produced
by angiotensin on rabbit aortic strips.
Fed.Proc. 14, 225 (1955)
21. Hickler, R.B., D.P. Lauler, G.W. Thorn:
Plasma angiotensinase activity in patients with hyperten-
sion and edema.
J.Clin.Invest. 42, 635 (1963)
22. Hirasawa, K.:
Studies on renin-angiotensin system.
(I) Studies on angiotensinase activity in liver diseases.
Jap.Circ.J. 32, 407 (1968)
23. Hiwada, K., H. Akutsu, S. Fujimoto, T. Kokubu, Y. Yamamura:
Separation of plasma angiotensinase by DEAE-Sephadex column
chromatography.
Clin.Chim.Acta 14, 410 (1966)
24. Hodge, R., K. Ng, J. Vane:
Disappearance of angiotensin from the circulation of the
dog.
Nature 215, 138 (1967)
25. Itskowitz, H.D., L. Miller:
Renal angiotensinase activity: Its localization and the
effects of mercury.
Circ.Res. 19, 507 (1966)
26. Itskowitz, H.D., L. Miller:
Differential studies of angiotensinase activities from
several tissue sources.
Amer.J.Med.Sci. 254, 659 (1967)
27. Jelinek, J., H. Mannel:
Inaktivierung von Angiotensin durch Rattennieren-Homogenat
nach unilateraler Nierenischämie, Adrenalektomie und Vor-
behandlung mit DOC und Kochsalz.
Arch.Exp.Pathol.Pharmacol. 264, 250 (1969)
28. Kaller, H.:
Pharmakologie des Trasylols: Neue Aspekte der Trasylol-
Therapie II.
F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart-New York 1968, S. 11-18
29. Khairallah, P.A., F.M. Bumpus, I.H. Page, R.R. Smeby:
Angiotensinase with a high degree of specificity in plasma
and red cells.
Science 140, 672 (1963)

30. Klaus, D., H. Kaffarnik, H. Pfeil:
Untersuchungen über Serumangiotensinase.
II. Klinische Ergebnisse beim Hochdruck und Lebererkrankungen.
Klin.Wschr. 41, 376 (1963)
31. Kurtz, A.B., E.D. Wachsmuth:
Identification of plasma angiotensinase as aminopeptidase.
Nature 221, 92 (1969)
32. Kuschinsky, G., H. Lüllmann:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage 1965, S. 75
33. Laragh, J.H., M. Angers, W.G. Kelly, S. Liebermann:
Hypotensive agents and pressor substances.
J.Amer.med.Ass. 174, 234 (1960)
34. Leary, W.P., J.G. Ledingham:
Removal of angiotensin by isolated perfused organs of the rat.
Nature 222, 959 (1969)
35. Lubash, G.D., W.S. Peart:
Determination of serum and plasma angiotensinase activity.
Clin.Chim.Acta 17, 445 (1967)
36. Nagatsu, I., L. Gillespie, J.E. Folk, G.G. Glenner:
Serum aminopeptidases, "angiotensinase", and hypertension-II.
Biochem.Pharmacol. 14, 852 (1965)
37. Ochswadt, B., H.D. Lowitz, K.O. Stumpe:
Influence of angiotensin on tubular function studied by micropuncture techniques in the rat.
Pflügers Archiv ges.Physiol. 330, 290 (1971)
38. Oelkers, W., I.U. v. Goldacker:
Bestimmung der Angiotensinase-(Aminopeptidase-)Aktivität im Serum mit einem DPN H-abhängigen optischen Test.
Klin.Wschr. 12, 649 (1967)
39. Ono, T., K. Eto, K. Arakawa:
Origin of urinary enzymes hydrolysing β -naphthylamides of L-leucine and L-glutamic acid.
Clin.Chim.Acta 19, 257 (1968)
40. Page, I.H.:
The production of persistent arterial hypertension by cellophane perinephritis.
J.Amer.Med.Ass. 113, 2046 (1939)

41. Peach, M.J., W.H. Cline, D.T. Watts:
Release of adrenal catecholamines by angiotensin II.
Circ.Res. 19, 571 (1966)
42. Regoli, D., B. Riniker, H. Brunner:
The enzymatic degradation of various angiotensin II derivatives
by serum, plasma or kidney homogenate.
Biochem.Pharmacol. 12, 637 (1963)
43. Ripa, R., B. Degli Atti, L. Civolani, R. Alvisi:
L'attivita angiotensinasica plasmatica ed eritrocitaria
nei vari trimestri della gravidanza normale.
Minerva Med. 60, 5205 (1969)
44. Ripa, R., B. Debli Atti, F. Zanardi, R. Squerzanti:
L'attivita angiotensinasica umana plasmatica ed eritrocitaria
in soggetti epatopatici.
Minerva Med. 61, 1314 (1970)
45. Ripa, R., P. Gilli:
Inibitori delle proteasi (trasylol e acido-aminocaproici)
ed angiotensinasi umana eritrocitaria in vitro.
Boll.Soc.Ital.Biol.Sper. 44, 1297 (1968)
46. Skeggs, L.T., E. Lentz, H. Hochstrasser, J.R. Kahn:
The chemistry of renin substrate.
Can.Med.Ass.J. 90, 185 (1964)
47. Skeggs, L.T., W.T. March, J.R. Kahn, N.P. Shumway:
Purification of hypertensin I.
J.expt.Med. 100, 363 (1954)
48. Strauch, L.:
Eine automatische Apparatur für die präparative Disk-
Elektrophorese in Polyacrylamidgel.
Wissenschaftl.-techn.Inform. Heft 2/10/68, 23
49. Sturm, A.J., H.W. Scheja:
Untersuchungen über die Wirkung des Angiotensins II auf
den Katecholaminstoffwechsel beim Menschen.
Klin.Wschr. 46, 658 (1968)
50. Svensson, H., in P. Alexander and R.J. Block (Eds.)
A laboratory manual of analytical methods in protein
chemistry including polypeptides.
Vol. 1, Pergamon Press, Ltd., London 1960
51. Tigerstedt, R., P.G. Bergmann:
Niere und Kreislauf.
Skan.Arch.Physiol. 8, 223 (1898)

52. Wachsmuth, E.D., I. Fritze, G. Pfleiderer:
An aminopeptidase occurring in pig kidney.
I. An improved method of preparation. Physical and enzymic properties.
Biochem. 5, 169 (1966)
53. Wolf, R.L., M. Mendlowitz, J. Pick, S.E. Gitlow, N. Naftchi:
In vitro degradation of I¹³¹ labelled angiotensin II by normotensive and hypertensive human serum.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 109, 308 (1962)
54. Wood, J.E.:
Genetic control of neutralization of angiotensin and its relationship to essential hypertension.
Circ. 25, 225 (1962)
55. Yamamura, Y., T. Kokubu, E. Ueda, S. Fujimoto, S. Kotani, A. Takahashi:
Angiotensinase in red cells.
Proc.Third Asian-Pacific Congr.Cardiol., Kyoto, 483 (1964)
56. Yang, H.Y.T., E.G. Erdös:
Fluorometric assay of angiotensinase C activity.
Pharmacologist 11, 271 (1969)
57. Yang, H.Y.T., E.G. Erdös, T.S. Chiang:
New enzymatic route for the inactivation of angiotensin.
Nature 218, 1224 (1968)
58. Yang, H.Y.T., E.G. Erdös, T.S. Chiang, T.A. Jenssen, J.G. Rodgers:
Characteristics of an enzyme that inactivates angiotensin II (angiotensinase C).
Biochem.Pharmacol. 19, 1201 (1970)
59. Zwanzig, M., W. Oelkers:
Vergleichende Untersuchungen über den Abbau von Angiotensin II und Angiotensin II-Amid durch Peptidasen des menschlichen Plasmas.
Verhandl.d.Deutschen Gesellschaft für innere Medizin 74, 426 (1968)

Lebenslauf

Am 20. Dezember 1942 wurde ich in Janessen/Kreis Karlsbad geboren. 1946 kam ich durch die Vertreibung nach Frauenstetten/Schwaben. Dort besuchte ich von 1947 - 1954 die Volksschule und anschließend das Deutsche Gymnasium in Lauingen/Donau, das ich im Juli 1962 mit dem Abitur abschloß. Von 1962 - 1964 leistete ich meinen Wehrdienst ab. Im Wintersemester 1964/65 begann ich an der Universität München das Studium der Medizin. Während meiner klinischen Semester erarbeitete ich am Physiologischen Institut dieser Universität unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. H. Dahlheim die experimentellen Grundlagen der vorliegenden Arbeit. Im Juni 1970 legte ich in München das medizinische Staatsexamen ab. Von Juli 1970 bis März 1971 arbeitete ich zunächst als Medizinalassistent, ab November 1970 als wissenschaftlicher Assistent am Physiologischen Institut der Universität München auf dem Gebiet des Renin-Angiotensin-Systems. Von April 1971 bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt bin ich als Assistenzarzt im Kreiskrankenhaus Donauwörth beschäftigt. Meine Approbation erhielt ich am 16. Dezember 1971. Ich bin verheiratet und habe zwei Kinder im Alter von 2 und 3 Jahren.

